

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-40937

(43)公開日 平成6年(1994)2月15日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
A 6 1 K 37/20	A A H	8314-4C		
C 0 8 B 37/00	Q	7329-4C		
	P	7329-4C		

審査請求 未請求 請求項の数11(全 31 頁)

(21)出願番号	特願平3-291844	(71)出願人	000199441 千葉製粉株式会社 千葉県千葉市美浜区新港17番地
(22)出願日	平成3年(1991)8月20日	(71)出願人	000193553 水野 伝一 神奈川県鎌倉市岡本18
(31)優先権主張番号	特願平2-218599	(71)出願人	390025210 杉 源一郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21
(32)優先日	平2(1990)8月20日	(72)発明者	杉 源一郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21
(33)優先権主張国	日本(JP)	(72)発明者	吉村 淳 千葉県千葉市磯辺3-26-7
(31)優先権主張番号	特願平2-312932		
(32)優先日	平2(1990)11月20日		
(33)優先権主張国	日本(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 LPSを含む鎮痛剤及び動物用鎮痛剤

(57)【要約】

【目的】 化学治療係数が高く、経口、経皮、注射のいずれでも投与可能な鎮痛剤、動物用鎮痛剤を提供する。

【構成】 下記LPSの少なくとも1種を含むことを特徴とする。LPSのインビトロで培養されるマクロファージのTNF産生能を活性化するLPSのマクロファージ活性化能を指標とし、縦軸に、そのLPSを添加しないときのマクロファージのTNF産生量を与えるマクロファージ活性化能を0%、マクロファージのTNF産生量を最大恒量にする時のLPSのマクロファージ活性化能を100%とするマクロファージ活性化能(%)を表し、横軸に、そのLPSのリムラステスト陽性LPS含有量を対数尺で表すシグモイド曲線を描くとき、マクロファージ活性化能のED₅₀を与えるリムラステスト陽性LPS含有量が0.4~100ng/培養液mlであるLPS。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 LPSを含む鎮痛剤であり、インビトロで培養されるマクロファージのTNF産生能を活性化するLPSのマクロファージ活性化能を指標とし、

縦軸に、そのLPSを添加しないときのマクロファージのTNF産生量を与えるマクロファージ活性化能を0%、マクロファージのTNF産生量を最大恒量にする時のLPSのマクロファージ活性化能を100%とするマクロファージ活性化能(%)を表し、横軸に、そのLPSのリムラステスト陽性LPS含有量を対数尺で表すシグモイド曲線を描くとき、マクロファージ活性化能のED₅₀を与えるリムラステスト陽性LPS含有量が0.4~100ng/培養液mlであるLPSの少なくとも1種を含む鎮痛剤。

【請求項2】 LPSが、植物から得られるLPS、細菌から得られるLPS、リビドA、それらの合成LPS及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項1記載の鎮痛剤。

【請求項3】 植物から得られるLPSが、小麦から得られ、次の物性を有するLPSである、請求項2記載の鎮痛剤。

主要分子量：8,000±1,000 (SDS電気泳動法による)

リン数：1~4/分子量8千

ヘキソサミン数：6±2/分子量8千

脂肪酸数：6±2/分子量8千

KDO数=5±1/分子量8千

【請求項4】 植物から得られるLPSが、クロレラから得られ、次の物性を有するLPSである、請求項2記載の鎮痛剤。

主要分子量=40,000~90,000 (SDS-PAGE法による)

リン数=4±1/分子量1万

ヘキソサミン数=7±1/分子量1万

脂肪酸数=6±1/分子量1万

KDO数=2±1/分子量1万

【請求項5】 細菌から得られるLPSが、大腸菌から得られ、次の物性を有するLPSである、請求項2記載の鎮痛剤。

主要分子量=40,000±10,000

8,000±4,000 (SDS-PAGE法による)

リン数=12/分子量3万

ヘキソサミン数=45±6/分子量3万

脂肪酸数=18/分子量3万

KDO数=5±1/分子量3万

【請求項6】 細菌から得られるLPSが、次の物性を有するLPSである、請求項2記載の鎮痛剤。

主要分子量：5,000±1,000 (SDS-PAGE法による)

2

リン数：2±1/分子量5,000

ヘキソサミン数：9±1/分子量5,000

KDO数：2±1/分子量5,000

【請求項7】 細菌から得られるLPSが、次の物性を有するLPSである、請求項2記載の鎮痛剤。

主要分子量：6,500±2,500 (SDS-PAGE法による)

リン数：1~2/分子量5,000

ヘキソサミン数：7±1/分子量5,000

KDO数：1~2/分子量5,000

【請求項8】 細菌から得られるLPSが、次の物性を有するLPSである、請求項2記載の鎮痛剤。

主要分子量：6,500±2,500 (SDS-PAGE法による)

リン数：2±1/分子量5,000

ヘキソサミン数：5±1/分子量5,000

KDO数：2±1/分子量5,000

【請求項9】 細菌から得られるLPSが、百日咳菌から得られ、次の物性を有するLPSである、請求項2記載の鎮痛剤。

主要分子量=6,000±1,000 (SDS-PAGE法による)

リン数=4/分子量6千

ヘキソサミン数=12/分子量6千

脂肪酸数=4/分子量6千

KDO数=2±1/分子量6千

【請求項10】 細菌から得られるLPSが、A. ラデイオバクターLPSである、請求項2記載の鎮痛剤。

【請求項11】 LPSを含む動物用鎮痛剤であり、インビトロで培養されるマクロファージのTNF産生能を活性化するLPSのマクロファージ活性化能を指標とし、縦軸に、そのLPSを添加しないときのマクロファージのTNF産生量を与えるマクロファージ活性化能を0%、マクロファージのTNF産生量を最大恒量にする時のLPSのマクロファージ活性化能を100%とするマクロファージ活性化能(%)を表し、横軸に、そのLPSのリムラステスト陽性LPS含有量を対数尺で表すシグモイド曲線を描くとき、

マクロファージ活性化能のED₅₀を与えるリムラステスト陽性LPS含有量が0.4~100ng/培養液mlであるLPSの少なくとも1種を含む動物用鎮痛剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、鎮痛剤及び動物用鎮痛剤に関する。より詳細には、本発明は、LPSを含む鎮痛剤及び動物用鎮痛剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 痛みは、身体のある部位に何らかの障害があることを示す警告反応である。従って、痛みをなくすためには、その原因の消退、除去、治癒を待つことが

必要であるが、それにはある程度の時間を要するので、多くの場合、根本療法と併用して、鎮痛剤が投与されている。又、慢性痛の場合には、時間の経過とともに痛みが憎悪することが多いので、鎮痛剤の投与は欠かせない。現在使用されている鎮痛剤は麻薬系鎮痛剤と非麻薬系鎮痛剤とに大別される。麻薬系鎮痛剤としては、塩酸モルヒネ、塩酸エチルモルヒネ、塩酸ペチジン、リン酸コデイン等が使用されている。これらはいずれも急性痛には著効を示すが、長期投与を余儀なくされる慢性痛に対しては、薬剤耐性、耽溺性の出現等により、所定の鎮痛効果が得られないことが多い。いずれにしても麻薬であることからして、投与に際しては最大限の注意が必要とされている。(昭和56年に株式会社メヂカルフレンド社が発行した「痛みの臨床」の70~74頁)一方、非麻薬系鎮痛剤の鎮痛作用は一般に麻薬系に比べて弱い

が、非習慣性であることが特徴である。これに属するものは数多く市販されており、アスピリン、フェニルブタゾン、ペンタゾシン等が代表例といえる。アスピリンは最も繁用されている鎮痛剤であり、アレルギー反応と大量投与に注意すれば、安全性は高いとされている。(前掲「痛みの臨床」の75頁)しかし、頭痛、関節痛、歯痛その他の外皮構造の痛みにはよく作用するが、内臓痛に対しては効果が薄いという欠点がある。(1986年に廣川書店が発行した「第十一改正日本薬局方解説書」のC-46頁)フェニルブタゾンは、鎮痛作用はアスピリンより弱い

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、高い鎮痛効果を有し、化学治療係数が高く、長期使用が可能であり、生産コストが安く、しかも、経口、経皮、注射いずれの経路でも投与が可能な、大量に供給可能な新規な鎮痛剤、動物用鎮痛剤を提供することを技術的課題とするものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】前記技術的課題は、高い鎮痛効果を有し、化学治療係数が高く、長期使用が可能であり、生産コストが安く、しかも、経口、経皮、注射いずれの経路でも投与が可能な、大量に供給可能なLPSを含む鎮痛剤、動物用鎮痛剤を提供することにより達成される。この鎮痛剤、動物用鎮痛剤には、インビトロで培養されるマクロファージのTNF産生能を活性化させるLPSのマクロファージ活性化能を指標とし、縦軸に、そのLPSを添加しないときのマクロファージのTNF産生量を与えるマクロファージ活性化能を0%、マクロファージのTNF産生量を最大かつ一定の値(本明細書の他の箇所においては、「最大恒量」と称す)にする時のLPSのマクロファージ活性化能を100%とするマクロファージ活性化能(%)を表し、横軸に、そのLPSのリムラステスト陽性LPS含有量を対数尺で表すシグモイド曲線を描くとき、マクロファージ活性化能のED₅₀を与えるリムラステスト陽性LPS含有量が0.4~100ng/培養液mlであるLPSの少なくとも1種が含まれる。ここで「少なくとも1種を含む」とは、本発明のLPSは各別に使用できることはもちろん、その意図される用途が阻害されない限り、それらの2種以上を任意に組み合わせ、又、更には他のいずれの物質とも組み合わせ使用できることを意味する。例えば、他の鎮痛剤、鎮静剤、催眠剤、鎮痙剤、鎮吐剤等と配合することもできる。

【0005】「マクロファージ」は、免疫担当細胞の一種であり、動物体内のほとんど全ての組織に分布し、粒子状の異物や体内の老廃細胞などを捕食して消化する大型のアメーバ状細胞の総称である。「TNF」は、マクロファージにより産生される腫瘍障害因子(Tumor Necrosis Factor)の総称であり[1985年に発行されたザジャーナルオブバイオロジカルケミストリー(The Journal of Biol. Chem.、260、2345~2354頁)、マクロファージの活性が高まるにつれてその産生量は増していく。「リムラステスト」は、1968年にレヴィン(Levin)が創案した、カプトガニ血球抽出液と発色合成基質を用いたエンドトキシン定量法である。本発明の鎮痛剤、動物用鎮痛剤の活性成分として使用できるLPSは、特にその採取源、生産方法、精製方法を限定されることはない。例えば、細菌や植物から採取されるLPSであっても、或は合成リピドAのような合成品であってもよい。なお、本明細書、特にその特許請求の範囲において、採取源は特に名称で特定されたそのものに限定されることなく、その採取源の成長、保存、流通の過程で付着、共存する細菌その他の全てのものが含まれる。例えば、「小麦LPS」と特定された場合には、小麦そのものから採取されたLPSのみならず、小麦の成長、保存、流通の過程で付着、共存する細菌その他の全てのものが含まれるものと理解されたい。

なぜならば、特に寄生植物、寄生動物という関係が解明されているもの以外にも、特定の植物、動物、菌界生物、地衣界生物に、それらにより付着、共存を許されたものが棲息している例が多く存在し得ることは当業界で良く知られていることであるからである。

【0006】これらLPSのうちから、本発明の鎮痛剤、動物用鎮痛剤の活性成分として使用できるLPSを選択するには、インビトロで培養されるマクロファージのTNF産生能を活性化するLPSのマクロファージ活性化能を指標とし、縦軸に、そのLPSを添加しないときのマクロファージのTNF産生量を与えるマクロファージ活性化能を0%、マクロファージのTNF産生量を最大恒量にする時のLPSのマクロファージ活性化能を100%とするマクロファージ活性化能(%)を表し、横軸に、そのLPSのリムラステスト陽性LPS含有量を対数尺で表すシグモイド曲線を描くとき、マクロファージ活性化能のED₅₀を与えるリムラステスト陽性LPS含有量が0.4~100ng/培養液mlであるものを選択すればよい。

【0007】リムラステスト陽性植物源LPS

原料植物として使用できるものを下記に例示する。なお、本明細書に記載した植物が帰属する科名、属名は、次の文献の記載を照合して決定された。

裸子植物、単子葉類、双子葉類、シダ植物、ソウ類：昭和57年(正編)、昭和58年(続編)に北隆館から発行された「原色牧野植物大図鑑」の記載を照合して所属を決定した。但し、「燕麦」は、昭和45年に女子栄養大学出版部から発行された「食用植物図説」と、昭和58年に至文堂から発行された「新日本植物誌頭花篇」の記載を照合し、「裸麦」は、昭和46年に東京同文書院から発行された「総合食品事典」の記載を照合し、「鳩麦」、「カラスビシャク」、「ジャノヒゲ」、「ウコン」、「マタタビ」、「アマチャヅル」、「ドクダミ」、「胡椒」、「トウガラシ」、「ダイウイキョウ」、「ダイダイ」、「クズ」、「ナンキンカンゾウ」、「オタネニンジン」、「ボウフウ」、「オオツツラフジ」、「ウンカリア・ヒルスタ」は、昭和63年に北隆館から発行された「原色牧野和漢薬草大図鑑」の記載を照合し、「アボガド」は、昭和53年に財団法人農林統計協会から発行された熱帯農業技術叢書第15号「ブラジルの果実」の記載を照合し、「カイワレダイコン」は、昭和59年に北隆館から発行された「原色園芸植物大図鑑」の記載を照合し、「ニクズク」は、昭和44年に廣川書店から発行された「図説熱帯植物集成」の記載を照合し、「クロレラ」は、財団法人日本健康食品協会が昭和61年に公示した、「クロレラ規格基準」の記載を照合して所属を決定した。

菌類：昭和62年に保育社から発行された「原色日本新菌類図鑑」の記載を照合して所属を決定した。但し、酵母は、昭和37年に技報堂から発行された「微生物学ハ

ンドブック」の記載を照合し、「冬虫夏草」は、前掲の「原色牧野和漢薬草大図鑑」の記載を照合して所属を決定した。

本発明で使用できる原料植物は、例えば、裸子植物、単子葉類、双子葉類、シダ植物、ソウ類、菌類の植物であり、これらは個別に或は混合して使用できる。裸子植物としては、例えば、マツ科マツ属植物であるマツを使用できる。単子葉類植物としては、例えば、イネ科イネ属植物であるイネ、イネ科コムギ属植物である小麦、イネ科オオムギ属植物である大麦、裸麦、イネ科カラス麦属植物である烏麦、燕麦、イネ科ササ属植物であるクマ笹、イネ科ジュズダマ属植物である鳩麦、アヤメ科アヤメ属植物であるアヤメ、ユリ科ネギ属植物であるニンニク、ユリ科キジカクシ属植物であるアスパラガス、ユリ科ジャノヒゲ属植物であるジャノヒゲ、ショウガ科ショウガ属植物であるミョウガ、ショウガ科ウコン属植物であるウコン、サトイモ科ハンゲ属植物であるカラスビシャクを使用できる。双子葉類植物としては、マメ科ダイズ属植物である大豆、マメ科インゲンマメ属植物である小豆、マメ科ソラマメ属植物であるそら豆、マメ科クズ属植物であるクズ、マメ科カンゾウ属植物であるナンキンカンゾウ、ナス科ナス属植物であるジャガイモ、トウガラシ、ナス科トマト属植物であるトマト、ナス科トウガラシ属植物であるトウガラシ、バラ科ビワ属植物であるビワ、バラ科サクラ属植物であるモモ、クスノキ科アボガド属植物であるアボガド、クルミ科クルミ属植物であるクルミ、ウリ科トウナス属植物であるカボチャ、ウリ科アマチャヅル属植物であるアマチャヅル、アブラナ科ダイコン属植物であるカイワレダイコン、マタタビ科マタタビ属植物であるマタタビ、ドクダミ科ドクダミ属植物であるドクダミ、コショウ科コショウ属植物である胡椒、シキミ科シキミ属植物であるダイウイキョウ、ニクズク科ニクズク属植物であるニクズク、ミカン科ミカン属植物であるダイダイ、ウコギ科オタネニンジン属植物であるオタネニンジン、セリ科サボシュニコピア属植物であるボウフウ、ツツラフジ科オオツツラフジ属植物であるオオツツラフジ、アカネ科カギカズラ属植物であるウンカリア・ヒルスタを使用できる。シダ植物としては、例えば、トクサ科トクサ属植物であるスギナ、ゼンマイ科ゼンマイ属植物であるゼンマイを使用できる。ソウ類植物としては、例えば、カッソウ類植物、紅ソウ類植物、緑ソウ類植物、ランソウ類植物を使用できる。カッソウ類植物としては、例えば、コンブ科ワカメ属植物であるワカメ、コンブ科コンブ属植物であるコンブ、ホンダワラ科ヒジキ属植物であるヒジキを使用できる。紅ソウ類植物としては、例えば、ウシケノリ科アマノリ属植物であるアサクサノリを使用できる。緑ソウ類植物としては、例えば、オオシスティス科クロレラ属植物であるクロレラを使用できる。菌類植物としては、例えば、担子菌類植物、子ノウ菌類植物を使用できる。担子菌類

植物としては、例えば、ヒラタケ科マツオウジ属植物である椎茸、キシメジ科エノキタケ属植物であるエノキ茸、キシメジ科シメジ属植物であるシメジ、タコウキン科マイタケ属植物であるマイ茸、サルノコシカケ科ポリボラス属植物であるアワビ茸、ハラタケ科ハラタケ属植物であるマッシュルーム、キクラゲ科キクラゲ属植物であるキクラゲ、モエギタケ科スギタケ属植物であるナメコを使用できる。子ノウ菌類植物としては、例えば、エンドミセタセア科サッカロミセス属植物であるパン酵母、醸造用酵母を使用できる。醸造用酵母にはビール酵母、清酒酵母、葡萄酒酵母、醤油酵母、味噌酵母等の他、サッカロミセス セレヴィシンドに属する多くの酵母（例えば、ウイスキーや老酒の製造に使用される酵母）が含まれる。又、バクカクキン科ノムシタケ属植物である冬虫夏草も使用できる。植物源LPSは、以下に述べる方法で分離、精製できる。

①原料植物を必要に応じて適宜細切、乾燥、粉碎した後に蒸留水によく懸濁し、上清を回収する。例えば、原料植物が穀類の種子である場合は、種皮をつけたまま、或は、種皮を除いた後に簡単に砕くか、又は、食用に供せられている程度の粉末になるまで粉碎し、得られた粉末に水を加えて分散液とし、攪拌した後に沈降物を静置又は遠心分離により除去するか、粉末に水を加えて練って得られるドウをミキサー中でゆるやかに水洗し、沈降物を除去すればよい。原料植物がクロレラである場合には、まず細胞膜を破砕し、エタノール洗浄により脂溶性物質を除去した後に水抽出するとよい。この水抽出の際の原料植物の粒度、水の温度、液性、添加量、攪拌の速度、時間、遠心分離の際の条件等は特に制限する必要はなく、原料植物の種類に応じて適宜調整すればよい。又、抽出水の温度は高い方がLPSの採取量、純度ともに高い傾向があるが、操作の便宜上、原料植物に含まれる澱粉の糊化を招来しない50℃以下とすることが好ましい。又、水の添加量は、原料植物の種類、粒度により異なるが、穀類種子の場合にはその割合が70w/v%以下、望ましくは20~50w/v%程度とすると操作上便宜である。更に、攪拌の速度は、起泡を引き起こさない程度のものですることが好ましい。なお、この段階の操作迄で、本発明のリムラステスト陽性植物LPSの純度は、リムラステスト活性データから判断して、例えば小麦種子の場合には約30倍に上昇する。以下、穀類種子を原料として使用する場合を例にとり説明するが、いわゆる当業者であれば、以下の記載を参考にして、他植物から夾雑する糖、蛋白等を除去してリムラステスト陽性LPSを高純度で回収する方法を実施することは極めて容易である。

②純度を更に上げるためには、上記①で得られた上清を常法に従って限外濾過に付して分子量5000以下の画分を除去すればよい。

③得られた乾燥品を、50mg/mlになるように蒸留

水に懸濁し、遠心分離操作に付して上清を回収する。

④この上清を氷水で冷却し、酸を添加して酸性にすると沈殿が生じる。この際使用する酸は特定のものである必要はなく、例えば、トリクロロ酢酸（以下、TCAと称す）、過塩素酸、トリフルオロ酢酸、酢酸、ジクロロ酢酸を使用できる。

⑤次いで、遠心分離操作に付して沈殿を回収して蒸留水で洗浄し、再度遠心分離操作に付して沈殿を回収する。

⑥沈殿を蒸留水に懸濁し、沈殿が溶解するまでアルカリを加える。この際使用するアルカリも特定のものである必要はなく、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア、炭酸ナトリウム、酢酸ナトリウムを使用できる。沈殿の溶解時に塩基性がpH11より大きくなると目的のLPSが失活するので注意が必要である。

⑦次いで酸を加えてpH8としてから37℃に加温し、更に酸を加えて酸性にすると沈殿が生ずるので、37℃に保温した遠心分離器を使用して遠心分離操作に付す。なお、この際使用する酸も特定のものである必要はない。

⑧上清を回収して氷冷し、4℃で再び遠心分離操作に付す。

⑨上清を回収し、アルカリを添加して中和し、常法に従って限外濾過で濃縮する。この際使用するアルカリも特定のものである必要はない。

▲10▼次いで常法に従ってゲル濾過に付して、リムラステスト陽性画分を回収して併せる。ゲル濾過用の担体としては、例えばセファデックス（Sephadex）G-75、G-100、セファクリル（Sephacryl）S-200、セファロース（Sephacrose）6B [以上は米国ファルマシア社（Pharmacia Inc.）製]、バイオゲル（Biogel）P-100 [米国バイオラッド（Biorad Inc.）社製]、トーヨーパールHW-50、HW-55（東洋曹達工業社製）を使用できる。緩衝液はpH3~10のものならいずれでもよい。例えば、トリス-HCl又はリン酸緩衝液を使用できる。

▲11▼次いでこの画分に蛋白分解酵素を加え、37℃で2時間以上インキュベーションして残存蛋白質を分解し、得られた酵素処理液を常法に従って限外濾過により濃縮する。なお、この際に使用する蛋白分解酵素も特定なものである必要はなく、例えば、V8プロテアーゼ、キモトリプシン、トリプシン、サーモライシンを単独で、或は任意に組み合わせて使用できる。市販品としては、例えば、プロナーゼE（科研化学社）、プロティネースK（メルク社）を使用できる。

▲12▼次いでこの画分を常法に従って、例えば、米国ファルマシア社製のFPLCシステムでファルマシア社製のモノQ-セファロース（Sephacrose）、Q-セファロース（Sephacrose）を使用して陰イオン交換クロマトグラフィーに付してリムラステ

スト陽性画分を得る。

▲13▼次いで、常法に従って脱塩のためにゲル濾過に付してリムラステスト陽性画分を回収する。

以上の操作により、小麦種子の場合には、当初のリムラス活性の約20%が回収され、純度約95%の精製標品が得られる。又、段階①終了時の純度に比べ約1000倍の純度（小麦種子の場合）になる。以上の方法によって得られたリムラステスト陽性植物LPSはそのまま、或いは任意の程度に濃縮した形で提供できる。又、保存性を高めるために、凍結乾燥や噴霧乾燥などの任意の手段により乾燥粉末として提供することもできる。これらはいずれも常法で生産できる。

【0008】リムラステスト陽性細菌源LPS

従来より知られている大腸菌LPS、アルカリゲネスラディオバクター（*A. radiobacter*）から得られるLPS [ピー、エイチ、グラハム（P. H. Graham）、エム、エイ、オーブリエン（M. A. O'Brien）共著、"アントニック ファン リーウヴェンホック（*Antonic van Leeuwenhoek*）、vol. 34、326~330頁（1968年）；以下、A. ラディオバクターLPSと称 *

小麦粉の名称

①ダーク・ノザン・スプリングス	米国
②1・カナディアン・ホイト	カナダ
③ハード・レッド・ウインター・セミハード	米国
④オーストラリアン・スタンダード・ホイト	オーストラリア
⑤ホロシリ	日本

上記細菌からLPS1、LPS2、LPS3を分離するには、ウェストファル（Westphal）等が「メソツズ イン カーボハイドレート ケミストリー（*Methods in Carbohydrate Chemistry*）のvol. V [米国ニューヨークのアカデミック プレス（Academic Press）社が1965年に発行]の83頁に記載した熱フェノール法を用い、更に、陰イオン交換樹脂で精製すればよい。即ち、菌体を蒸留水に懸濁した後、蒸留水と等容量の熱フェノールと共に攪拌し、次いで、遠心分離により水層を回収し、この水層を透析に付してフェノールを除去し、限外濾過により濃縮して粗LPS画分を得、この画分を常法に従い、例えば、ファルマシア社製のFPLCシステムでファルマシア社製のモノQ-セファロース（*Sephacrose*）、Q-セファロース（*Sephacrose*）を使用して陰イオン交換クロマトグラフィーに付して精製し、更に、常法に従って脱塩すればよい。以上の操作により、純度96%以上の精製標品が得られる。原料中のリムラステスト陽性LPSの検出、含量測定は、後記実験例1に詳述する通り、例えば、生化学工業株式会社からトキシカラーシステムという名称で市販されている試薬セットを使用して実施できる。即ち、原料植物を同システムのLS-1セットと合わせて発色さ

*す]、百日咳菌LPS、リピドA等の他、本明細書で追って詳述する細菌源LPS1、LPS2、LPS3及びそれらの合成LPSが該当する。大腸菌LPSは、例えば、米国ディフコ（*Difco*）社から市販されている。百日咳菌LPSは、例えば、フナコシ薬品（日本）から市販されている。又、公知の百日咳菌、例えば、東浜株I相菌の死菌体から、例えば、下記文献記載の公知方法により調製することもできる。ウェブスター（*Webster*）等著の「ジェイ、イミュノロジー（*J. Immunol.*）、744、55（1955）；ウェストファル（*Westphal*）等著の「ツェット、ナツールフォルシュ（*Z. Naturforsch.*）、76、148（1952）。リピドAは、例えば、第一化学薬品から市販されている。上記菌源LPS1、LPS2、LPS3をそれぞれ産生する3種の菌は、本発明者等が検討した小麦からはその産地、種類を問わず分離されている。従って、いずれの産地、種類の小麦及びその加工品からも分離されると推定される。本発明者等がそれら3種の細菌を分離できることを確認した小麦粉の産地、種類は次の通りである。

せ、その発色の強さを、同じく同セットのEt-2セットを使用して作成した検量線と対比させればよい。糖はフェノール-硫酸法 [エム、デュボイス（*M. Dubois*）等著、アナリティカル ケミストリー（*Analytical Chemistry*）、vol. 28、350頁、1956年]で、蛋白はローリー法 [オー、エイチ、ローリー（*O. H. Lowry*）等著、ジャーナルオブ バイオロジカル ケミストリー（*Journal of Biological Chemistry*）、vol. 193、65頁、1951年]で測定した。

【0009】LPSがマクロファージのインビトロTNF産生能を活性化する能力の測定方法

動物体内にTNFを産生させるためには、産生前駆（プライミング）段階と産生開始（トリガリング）段階とが必要であることは、カーズウェル（*Carswell*）らにより、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー [Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、72、3666~3670頁（1975年）]に報告されている。プライミング段階開始のために投与される薬剤が「プライマー」（内因性TNF産生促進剤）であり、トリガリング段階開始のために投与される薬剤が「トリガー」（内

因性TNF産生剤)である。LPSがマクロファージのインビトロTNF産生能を活性化する能力を測定するには、マウスのマクロファージ腹腔常在細胞を採取し、これにプライマーとしての組み換えマウスIFN- γ を添加し、次いで、トリガーとしてのLPSを添加し、そのTNF活性を測定すればよい。TNF活性は、L-929細胞[プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー72、3666~3670頁]に対する細胞毒性を基にして、次のようにして測定する。L929細胞を、5%仔牛胎児血清を加えたイーグルミニマムエッセンシャル培地(以下、MEM培地と表す)で育成し、 8×10^4 個の細胞が100 μ lの同上培地に含まれる様にし、96穴の平底プレートで育種する。育種条件は37 $^{\circ}$ C、2時間、5%CO $_2$ 、100%H $_2$ Oであり、通常の細胞培養に用いられる方法でよい。その後、アクチノマイシンDを培地中に終濃度1 μ g/mlとなるように加え、培養液の液量を150 μ lとする。即座に、検体を適当にMEM培地で希釈したものを50 μ l加える(この際希釈率を適宜調整し、ED $_{50}$ を求める事ができる)。更に、最終液量200 μ lとなったL929細胞を上記条件で18時間培養する。細胞障害活性を測定するには、まず全培地を除去し、ついで0.1%クリスタルバイオレットを含む1%メチルアルコール溶液を加えて固定染色する。クリスタルバイオレットは全有核細胞を染色するが、死細胞は染色後にプレート底面より水洗で除去されるので、生存細胞の結果から細胞障害活性を直接測定できる。この染色度をOD(590nm)での吸光度を指標として測定し、対照群に対する染色度と比較する事で細胞障害活性を測定する。活性の定義は次の様に行う。L929細胞が50%生存できる検体の希釈率(N)を求める。対照としてウサギTNS[腫瘍障害血清(Tumor Necrosis Serum)]を使用し、このウサギTNSの活性n(単位/ml)を 2.4×10^6 単位/mg/mlのTNF- α を用いて決定する。このウサギTNSのED $_{50}$ を与える希釈率(C)を求める。検体活性(単位/ml)は $N/C \times n$ で計算する。

【0010】提供できる剤の製造方法

本発明の鎮痛剤は、常法の製剤技術により、散剤、顆粒剤、丸剤、錠剤、トローチ剤、カプセル剤、液剤、貼付剤、軟膏剤、リニメント剤、ローション剤、坐剤、注射剤等の形態で提供できる。又、動物用としては、更に、飼料添加剤、プレミックス製剤、飲水添加剤として調製することもできる。飼料添加剤とする場合には、粉剤か顆粒剤とすることが好ましい。又、プレミックス製剤とは、飼料との混合を容易にするために澱粉などの飼料成分で希釈されたものを指す。本発明の鎮痛剤を飼料添加剤、プレミックス製剤として添加できる飼料は市販されている飼料のいずれでもよい。又、ミネラル、ビタミン、アミノ酸等の飼料添加物を含む飼料であってもよ

い。これら製剤には、所望ならば、保存性、均質性を保持するために、常法により賦形剤、保存剤、緩衝剤等の添加剤を加えることもできる。更に、矯味剤、矯臭剤、着色剤を含めることもできる。賦形剤としては、例えば、乳糖、デンプンを使用できる。保存剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル等のパラオキシ安息香酸エステル類、デヒドロ酢酸ナトリウム、フェノール、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン等を使用できる。緩衝剤としては、例えば、クエン酸塩、酢酸塩、リン酸塩等が使用できる。

【0011】鎮痛効果の確認

本発明の鎮痛効果は、非麻薬系鎮痛剤検定法の1つとして確立されている「酢酸-ライズィング(Writhing)法」(1982年に医歯薬出版株式会社から発行された「炎症と抗炎症療法」の415頁)による動物実験と、エイズ患者における臨床結果により確認した。酢酸-ライズィング法では、マウスに酢酸を与え、酢酸に起因する「身もだえ(ライズィング)」の発生頻度を予防する度合いを、炎症性疼痛の緩和に繁用されているフェニルブタンゾンとの比較も含めて観察した。以下、実施例、製造例、実験例により、本発明を更に詳細に説明する。なお、それらで使用された「大腸菌LPS」は、米国ディフコ(Difco)社製O128:B8である。

【0012】製造例1(小麦LPSの製造)

①小型ニーダに、1.09%の灰分を含む硬質小麦粉(アメリカ又はカナダ産のハードレットスプリング)(3,120g)を入れ、2.03lの蒸留水を加えて10分間練ってドウとした。15分間の静置後に10lの水を加えてゆるやかに攪拌してデンプン乳液を洗い出し、同時に可溶性成分を溶出させた。この溶出液を5 $^{\circ}$ Cの冷蔵庫中で12時間静置した後、デンプン等の沈降部を除去した。上澄み液を凍結乾燥して201.1gの粉末を得た(粉末A)。更に、残留ドウに5lの蒸留水を加えてゆるやかに攪拌し、以下、上記と同様に処理して40.1gの粉末を得た(粉末B)。

②これら粉末A、Bを米国アミコン社製限外濾過機HF-Lab1に供し、分子量画分5,000については中空系カートリッジHF-Lab1PM5を、分子量画分10,000については中空系カートリッジHF-Lab1PM10を取り付けて限外濾過を行った[温度5~10 $^{\circ}$ C。入圧25psi(1.76kg/cm 2)、出圧15psi(1.06kg/cm 2)]。その結果に基づき各部分を次のように命名した。

粉末A:分子量5,000以下の部分をa $_1$

分子量5,000以上の部分をa $_2$

粉末B:分子量5,000以下の部分をb $_1$

分子量5,000以上の部分をb $_2$

粉末A:分子量10,000以下の部分をa $_3$

分子量10,000以上の部分をa $_4$

粉末B：分子量10,000以下の部分をb₃。

分子量10,000以上の部分をb₄。

これら各画分を後記実験例1に詳述する方法に準拠してリムラステストに付したら、分子量5,000以上の画分には多量のリムラステスト陽性成分が存在するが、分子量5,000以下の画分にはほとんど存在しないことが確認された。

③上記粉末a₂の30gを1l三角フラスコに入れ、600mlの蒸留水を注いで、60分間スターラーで攪拌した後、日立冷却高速遠心機SCR-20B（ローターRPR16を事前に4℃に冷却しておいた）で4℃で遠心分離操作（10,000G×10分）に付して上清を回収した。

④この上清を1l三角フラスコに入れ、氷冷下（液温約2℃）、スターラーで攪拌しながら、事前に2℃に冷却してあった100%TCA水溶液20.5mlを滴下し、滴下終了後氷水中に10分間放置した。

⑤次いで前記と同様に4℃で遠心分離操作（10,000G×10分）に付して沈殿を回収し、氷水中で冷却下、300mlの蒸留水と共に500mlのビーカーに入れて懸濁し、氷水中で冷却し、前記と同様に4℃で遠心分離操作（10,000G×10分）に付して沈殿を回収した。

⑥この沈殿を1lビーカーに入れ、蒸留水500mlで懸濁し、1N水酸化ナトリウム溶液約3.5mlを使用して中和（pH7）し、ついで、氷水中で冷却しながら、1N水酸化ナトリウム溶液約2mlを添加して0.02N水酸化ナトリウム溶液になるようにして沈殿を溶解した。

⑦1N塩酸約1.5mlを加えてpH8とし、次いで100mlの蒸留水を加えた後に1l三角フラスコに移して37℃のインキュベーター内で30分間ゆっくり振盪した。

⑧100%TCA水溶液30mlを加えて混合した後、37℃のインキュベーター内で10分間ゆっくり振盪してから、約37℃に保温した遠心分離器トミーCD100R（トミー精器社製）を使用して遠心分離操作（3,000G×10分）に付した。

⑨上清を回収して氷冷し、4℃で遠心分離操作（10,000G×10分）に付した。

▲10▼上清を回収して10N水酸化ナトリウム溶液約3.6mlで中和してpH7とし、限外濾過器（東洋濾紙UHP-150、フィルター：UK-10、N₂圧：4.0kg/cm²）で濃縮した。

▲11▼得られた濃縮液60mlを、セファロース（Sephacrose）6Bカラム〔米国ファルマシア社（Pharmacia Inc.）製、カラムサイズ：5cm（内径）×100cm（2リットル）〕を使い、ゲル濾過〔緩衝液：10mMトリス-HCl/10mM NaCl（pH7.5）、流速：60ml/時〕に付し

て、各20mlの画分を得た。

▲12▼初めから43番目から56番目迄の画分280mlを併せ、プロナーゼE（科研化学社）450μgを加え、振盪下、37℃に2時間保温した後に、限外濾過器（東洋濾紙UHP-62、フィルター：UK-10、N₂圧：4.0kg/cm²）で濃縮した。次いで、ファルマシア社製FPLCシステム（カラム：モノQHR10/10）を使って陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。即ち、10mMトリス-HCl（pH7.5）と10mMのNaClを含む緩衝液で試料をカラムに付した後、上記緩衝液でNaCl量が165mMに増加された組成を持つ緩衝液（200ml）でカラムを洗った。次いで、NaCl濃度を、165mMから1MのNaCl濃度勾配になるように増加させながら全量400mlで目的LPSを溶出させ、各2mlの画分を回収した。リムラステスト陽性が確認された、濃度勾配をかけてから5～8番目の画分を併せて、LPS純度約92%の8ml〔LPS：3.03mg（後記実験例1記載の方法で測定したリムラステスト陽性LPS換算値である。以下のLPS量も全てこの換算値である）、糖：0.23mg、蛋白：0.04mg）を回収した。

▲13▼次いでその8mlを、セファデックス（Sephadex）G-25〔カラム：2.0cm（内径）×20.2cm（66ml）〕を使ってゲル濾過（緩衝液：水）に付して各3mlの画分を回収した。リムラステスト陽性の確認された第9～12番目の画分を併せて、LPS純度約95%の12ml（LPS：2.7mg、糖：0.18mg、蛋白：0.03mg）を回収した。なお、この画分は、陰イオン交換クロマトグラフィーにより酸性であることを確認した。又、SDSゲル電気泳動法による分子量は6,000～10,000だった。

▲14▼上記画分を-80℃で凍結後に恒量になるまで凍結乾燥し、重量を測定したら0.75mgあった。（以下、この凍結乾燥標品を小麦LPSと称す）この小麦LPSのリムラ活性を後記実験例1記載の方法で測定したら2.7mgに相当するので、その比活性は2.7÷0.75=3.6になる。また、夾雑物として存在し得る単独の糖は、以上の精製により実質上全て除去されたと考えられるので、検出された糖は全て、小麦LPSを構成している糖と考えられる。従って、この段階での小麦LPSの純度を重量に基づいて計算すると蛋白=0.03mg、LPS=0.75-0.03=0.72mgだから、0.72÷0.75×100=96（%）である。

【0013】小麦LPSの物性

▲15▼分子量
小麦LPSを蒸留水に溶解して1mg/ml溶液を調製し、その4μlを1.5mlのトレフチューブに入れ

50

た。これに、別途、1mMのEDTAに2.5%SDS、5%メルカプトエタノール、10mMトリス塩酸(pH8.0)を加えて調製したSDS処理液1 μ lを加え、この混液を3分間沸騰水に浸した。ファルマシア社製のファストシステム(Phast System)を使用し、電極との間にSDS-バッファーストリップ(Buffer Strip)(ファルマシア社製)が介在せられた1 μ lの上記混液をゲル[ファルマシア社製のファストゲルグラディエント(Phast Gel Gradient 8-25)に塗付し、最大電圧250v、最大電流10mAにセットして泳動を開始させた(本明細書でこの泳動法をSDS電気泳動法と称する)。泳動終了後、クマシー染色と銀染色における挙動を観察した。クマシー染色では、染色液としてファルマシア製の0.1%ファストゲルブルー(Phast Gel Blue) Rを、脱色液として、メタノール:酢酸:蒸留水(容量比3:1:6)混液を使い、次の順序で染色・脱色した。

- 1) 50℃で8分間染色
- 2) 50℃で5分間脱色
- 3) 50℃で8分間染色
- 4) 50℃で10分間脱色
- 5) 50℃で5分間保護(グリセロール、酢酸、蒸留水の容量比5:10:85混液)

6) 乾燥

銀染色は、次の順序で行った。

- 1) 50℃で2分間、洗浄液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比5:1:4混液)で処理
- 2) 50℃で2分間、洗浄液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理
- 3) 50℃で4分間、洗浄液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理
- 4) 50℃で6分間、増感液(8.3%グルタルジアルデヒド)で処理
- 5) 50℃で3分間、洗浄液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理
- 6) 50℃で5分間、洗浄液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理
- 7) 50℃で2分間、洗浄液(脱イオン水)で処理
- 8) 50℃で2分間、洗浄液(脱イオン水)で処理
- 9) 40℃で13分間、0.25w/v%硝酸銀で処理
- 10) 30℃で30秒間、洗浄液(脱イオン水)で処理
- 11) 30℃で30秒間、洗浄液(脱イオン水)で処理
- 12) 30℃で30秒間、現像液(0.04v/v%ホルムアルデヒド+2.5w/v%炭酸ナトリウム洗浄液)で処理
- 13) 30℃で4分間、現像液(0.04v/v%ホルムアルデヒド+2.5w/v%炭酸ナトリウム洗浄液)で処理
- 14) 50℃で2分間、反応停止液(5%v/v%酢

酸)で処理

- 15) 50℃で3分間、保護液(酢酸、グリセロール、蒸留水の容量比10:8:85混液)で処理

16) 乾燥

LPSは銀染色に染まるが、クマシー染色には染まらない性質を利用して染色帯を観察したら、分子量8,000 \pm 1,000の位置に小麦LPSの主要染色帯が検出された。

▲16▼リン含有量

- 10 チェントリバラ(Chen-Toribara)法
[チェン等著、「アナリティカルケミストリ(Analytical Chemistry)、vol. 28、1756~1758頁(1956年)に準拠して次の通りに行った。小麦LPSを蒸留水に溶解して、25 μ gの小麦LPSを含む20 μ lの溶液を調製し、小試験管に入れた。20 μ lの50v/v%硫酸を添加し、160℃で2時間加熱した。次いで、20 μ lの10v/v%過塩素酸を添加した後にガスバーナーで1分間加熱して灰化させた。その後、0.5mlの蒸留水、
- 20 次いで0.5mlの反応試薬(1mlの6N硫酸、2mlの蒸留水、2mlの2.5v/w%モリブデン酸アンモニウム及び1mlの10v/w%のアスコルビン酸を混合して調製し、その0.5mlを使用)を添加して室温で30分間放置した後に、820nmでの吸光度(OD_{820nm})を測定した。なお、検量線作製の試料としては、リン酸二水素カリウム(和光純薬社製)を蒸留水で希釈し、リン重量としてそれぞれ2.5 μ g、1 μ g、0.25 μ g、0 μ gを含む0.5mlの溶液を調製して使用した。なお、リン1gはリン酸二水素カリウム4.39gに相当する。得られた結果を表1に示す。

【表1】

OD _{620nm}	検 体
	リン酸二水素カリウム (リン換算値: μg)
0.002	0
0.150	0.25
0.620	1.0
1.559	2.5
	小麦LPS (4検体) (検量線から計算した リンの重量: μg)
0.036	0.1
0.073	0.2
0.104	0.3
0.139	0.4

表1において、小麦LPSのデータは、無機リンの混入（例えば、リン酸緩衝液に由来する）による誤差を避けるために、加熱処理をしていない対照のデータを減じた値である。小麦LPSの分子量を8,000と仮定し、上表の結果に基づいてその1分子当たりのリン数を次式により計算すると1~4になる。

【数1】

$$\text{リン重量} \times 10^{-6} \times \frac{\text{分子量}}{25 \times 10^{-6}} \times \frac{1}{32}$$

上記実験でリン数が1~4と変動している原因の1つとしては、精製段階でのモノフォスフォエステラーゼの混入により、リン酸が脱離したことも考えられる。

▲17▼ヘキソサミン含有量

エルソン-モルガン (Elson-Morgan) 法
(東京化学同人出版「生化学実験講座」No. 4の377~379頁) に準拠して次の通りに行った。小麦LPSを蒸留水に溶解して1mg/mlの溶液を調製し、その100 μl をスクリーキャップ付きスピッツ (イワキガラス社製) に入れ、これに100 μl の8NHC1

を添加して110℃で16時間加熱した。4N NaOHを約200 μl 添加してpH7とした。その100 μl を分取し、別のスクリーキャップ付きスピッツに入れ、200 μl の下記試薬Aを加えた後に、105℃で1.5時間加熱し、次いで流水で冷却した。次いで、100 μl を分取し、670 μl の96%エタノールを加え、更に、67 μl の下記試薬Bを加えた後に室温で1時間放置し、535nmで吸光度を測定した。検量線作製用試料としては0.20~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のN-アセチル グルコサミン (和光純薬社製) を使用した。

(試薬A) 75 μl のアセチルアセトンと2.5mlの1.25N炭酸ナトリウムを混合して調製。

(試薬B) 1.6gのp-ジメチルベンズアルデヒドと30mlの濃塩酸と30mlの96%エタノールを混合して調製。

結果、小麦LPSのヘキソサミン数は 6 ± 2 /分子 (仮定分子量8,000) だった。

▲17▼脂肪酸含有量

90 μl の小麦LPS蒸留水溶液 (1mg/ml) に10 μl の内部標準 (0.55mMのマルガリン酸) を加えた。1.0mlの0.5Mナトリウムメチラートを加えて脂肪酸エステルの加水分解とエステル化を行った。室温で1時間放置後に960 μl の0.5NHC1を加えて中和した。これに2mlのヘキサンを加えて15分間激しく攪拌した。次いで、1,000gで5分間遠心分離を行いヘキサン層を分取した。窒素ガスでヘキサンを蒸発させて、約20 μl になるまで濃縮した。このサンプルをガスクロマトグラフィー [本体: 島津社製のGC8APF、キャピラリーカラム: カナダのスペルコ

(Spelco) 社製FSCAP Sp2330、キャリアガス: 窒素] に付して脂肪酸量を測定した。脂肪酸量測定の基準としては、第一化学薬品社製の合成リピドAである大腸菌型LA-15-PP (分子量2,000で、1分子中の脂肪酸数は6であることが知られている) を用いた。結果、小麦LPSの脂肪酸数は 6 ± 2 /分子 (仮定分子量8,000) であると推定された。上記ガスクロマトグラフィーで観察されたチャートを添付図面第1~3図に示す。第1図は小麦LPSの、第2図は大腸菌LPSの、第3図は百日咳菌LPSのチャートである。第1~3図において、図示されている主要ピーク番号に対応する保持時間 (分) は次の通りであった。

19

第1図:	ピーク番号	保持時間(分)
	1	2.450
	2	2.758
第2図:	ピーク番号	保持時間(分)
	1	2.417
	2	2.742
第3図:	ピーク番号	保持時間(分)
	1	2.433
	2	3.028

20

第1～3図の比較により、小麦LPSのチャートは大腸菌LPSのチャートに似ているが、百日咳菌LPSのものとは大きく異なることは明白である。

▲18▼KDO含有量

KDO(2-ケト-3-デオキシオクトネート)含有量をジフェニルアミン法[シャビーアル(Shaby R.)等著、アナリティカル バイオケム(Analytical Biochem.)、58(1)、123～129頁(1974年)]に準拠して次の通りに行った。500mgのジフェニルアミン、5mlのエタノール、45mlの氷酢酸、50mlの濃塩酸(全て和光純薬社製)を合わせてKDO検出試薬を調製した。その500μlに、1.05mg/mlの小麦LPSを含む蒸留水250μlを合わせ、100℃の沸騰水浴中で30分間加熱後に冷水(23℃)中で30分間冷却し、ついで日立分光光度計320を使って420、470、630、650nmでの紫外吸収を測定した(測定値をそれぞれA420、A470、A630、A650とする)。標準試料としては、127μg/mlのKDOアンモニウム塩[米国シグマ(Sigma)社製]を含む蒸留水250μlを使用した。検体試料、標準試料それぞれについて、次式の値を求めた。

$$S = A_{420} - A_{470} + A_{630} - A_{650}$$

検体試料の値(S_r)は0.379、標準試料の値(S_s)は0.294であった。この値の比較により、小麦LPSには 5 ± 1 モル/分子量8千のKDOが含まれると推定された。

【0014】製造例2(クロレラLPSの製造)

①細胞膜破碎クロレラ(株)マンナンフーズ社製)30gを、洗浄液が緑色に着色しなくなるまでエタノールで洗浄した。

②この洗浄残渣26gを100mg/mlの濃度で蒸留水に溶かし、45℃で2時間振盪後に遠心分離操作(4℃、10,000G×30分)に付した。

③上清を回収し、東洋濾紙No.2で濾過し、次いで蒸留水で抽出した。

④抽出液290mlを下記条件で陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。

カラム:Q-セファロース(φ3cm×23cm、容量約180ml)

緩衝剤:10mMトリス-HCl(pH7.5)、NaCl濃度勾配:10mM、400mM、1M

流速:100～200ml/時

温度:室温

⑤素通りした画分310mlをグルコアミラーゼで処理して澱粉を分解した(pH5.0、40℃、約2時間)。澱粉の分解は、ヨウ素澱粉反応で着色が生じないことにより確認した。

⑥遠心分離(10,000G×10分)に付して上清を回収し、10N NaOH溶液で中和してpH7とし、分子量20万カットのポアサイズを有するウルトラフィルターを使って限外濾過して、分解物の除去及び濃縮を行った。

⑦得られた濃縮液30mlをファルマシア社製FPLCシステム(カラム:モノQHR10/10)を使って陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。即ち、10mMトリス-HClと10mMのNaClを含む緩衝液(pH7.5)で試料をカラムに付した後、上記緩衝液でNaCl量が165mMに増加された組成をした液(200ml)でカラムを洗った。次いで、目的LPSを溶出するため、165mMから1MのNaCl濃度勾配になるようにNaCl濃度を増加させながら全量400mlでカラムを洗い、各2mlの画分を回収した。リムラステスト陽性が確認された、濃度勾配をかけてから5～8番目の画分を併せた。

⑧次いでその8mlを、セファデックス(Sephadex)G-25[カラム:2.0cm(内径)×20.2cm(66ml)]を使ってゲル濾過(緩衝液:水)に付して各3mlの画分を回収した。リムラステスト陽性の確認された第9～12番目の画分を併せて12mlを回収した(LPS:14.3mg、糖:2.0mg、蛋白:0.53mg)。LPSは後記実験例1記載の方

法で測定した。

⑨上記画分を -80°C で凍結後に恒量になるまで凍結乾燥し、重量を測定したら 5.8mg あった。(以下、この凍結乾燥標品をクロレラLPSと称す)このクロレラLPSのリムラス活性は 14.3mg に相当するので、その比活性は

$$14.3 \div 5.8 = 2.5$$

になる。また、以上の精製で、夾雑物として存在し得る単独の糖は実質上全て除去されたと考えられるので、検出された糖は全て、クロレラLPSを構成している糖と考えられる。従って、この段階でのクロレラLPSの純度を重量に基づいて計算すると、

$$\text{蛋白} = 0.53\text{mg}$$

$$\text{LPS} = 5.8 - 0.53 = 5.27\text{mg}$$

だから、

$$5.27 \div 5.8 \times 100 = 91 (\%) \text{である。}$$

クロレラLPSの物性

製造例1に記載の方法と同様にして、次の値が得られた。但し、分子量は、後記製造例4に記載のSDS-PAGE法により測定した。

主要分子量 $=40,000 \sim 90,000$

リン数 $=4 \pm 1$ /分子量1万

ヘキソサミン数 $=7 \pm 1$ /分子量1万

脂肪酸数 $=6 \pm 1$ /分子量1万

KDO数 $=2 \pm 1$ /分子量1万

【0015】製造例3(百日咳菌LPSの製造)

千葉県血清研究所から入手した試験用百日咳菌液(2.0×10^{10} 細胞/ml)を死菌体として用いた。上記死菌体を 25mg (乾燥重量)/mlとなるように滅菌水に懸濁した。これに等量の90%熱フェノール液($68 \sim 70^{\circ}\text{C}$)を添加し、 68°C で1時間振盪しながら抽出した。8,000G、 4°C で20分間遠心分離して水層を分取した。残りのフェノール層に、上記水層と等量の滅菌水を加えて同様の抽出を行った。得られた水層を先の水層と合わせて流水中で一晩透析後に、ロータリーエバポレータで1/10に濃縮した。これを8,000G、 4°C で20分間遠心分離した。上清を分取し、酢酸ナトリウムを少量加え、 $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ の冷エタノールを6倍量加えて -20°C で一晩放置した。4,000G、 4°C で30分間遠心分離して回収した沈殿物をエタノールで2回、次いでアセトンで1回遠心洗浄し、アスピレータで乾燥させた。残さを、 20mg/ml となるように蒸留水に懸濁し、米国ブランソン(Branson)社製のソニファイア185型で超音波処理(出力コントロール5、15分、室温)に付した。次いで2,500G、 4°C で10分間遠心分離し、上清を分取した。この上清を 4°C で、米国シグマ(Sigma)社製の核酸分解酵素DNase I、RNase Aで15~16時間処理した(最終的には $10\mu\text{g/ml}$ のDNase Iと、 $20\mu\text{g/ml}$ のRNase Aを使用した)。更に同

じ濃度の核酸分解酵素を加えて 37°C で2時間加温した。次いで2,500G、 4°C で10分間遠心分離し、上清を分取した。この上清を米国ゲルマン(Gelman)社のアクロディスク(Acrodisc)を使い、孔径 $0.2\mu\text{m}$ で濾過した。濾液を分子篩にかけ[樹脂:米国ファルマシア(Pharmacia)社製セファロース(Sephacrose)6B、カラムサイズ=内径 $5\text{cm} \times$ 長さ 100cm 、緩衝液 $=10\text{mM}$ のトリス-HCl、 10mM のNaCl(pH7.5)、流速 $\approx 3\text{ml/cm}^2$ /時)、生化学工業社製のLS-1キットを用いてリムラス活性陽性画分を調べて合わせ、上記ゲルマン社のアクロディスクを使い、孔径 $0.2\mu\text{m}$ で濾過した。濾液をイオン交換にかけ[装置:米国ファルマシア(Pharmacia)社製FPLC、樹脂:米国ファルマシア社製モノQ HR10/10、緩衝液 $=10\text{mM}$ のトリス-HCl+ 10mM のNaCl(pH7.5)で15分洗浄し、次いで、NaCl量を 165mM に増加して30分洗浄し、次いで、20分かけて、NaCl量が 165mM から1Mの濃度勾配になるようにNaCl量を増加させながら洗浄し、次いで、1MのNaCl量で30分洗浄する、流速 $=2\text{ml/分}$ 、生化学工業社製のLS-1キットを用いてリムラス活性陽性画分を調べて合わせた。合わせた画分をカラムで脱塩し[樹脂:米国ファルマシア(Pharmacia)社製セファデックスG-25ファイン(fine)、カラムサイズ=内径 $2\text{cm} \times$ 長さ 25cm 、溶出液=蒸留水]、次いで凍結乾燥した。この凍結乾燥標品(4.50mg)に混入している可能性の最も高い物質は核酸である。そこで、紫外吸収曲線($200 \sim 400\text{nm}$)をとり、 260nm での吸光度を求めた。吸光度1のときの核酸濃度が $50\mu\text{g/ml}$ であることを用いて上記吸光度から核酸濃度を算出したら1%以下であった。又、SDS電気泳動では蛋白質は明確には検出されなかった。従って、検出感度を考慮すると、上記凍結乾燥標品に混入している蛋白質は高々 $0 \sim 3\%$ と推定される。従って、上記凍結乾燥標品の純度は96%以上と推定された。製造例1に記載の方法と同様にして測定されたこの百日咳菌LPSの物性は次の通りであった。但し、分子量は後記製造例4に記載のSDS-PAGE法によって測定した。

百日咳菌LPSの物性

主要分子量 $=6,000 \pm 1,000$ 、

リン数 $=4$ /分子量6千

ヘキソサミン数 $=12$ /分子量6千

脂肪酸数 $=4$ /分子量6千

KDO数 $=2 \pm 1$ /分子量6千

【0016】なお、製造例1に記載の方法と同様にして測定された大腸菌LPS[米国ディフコ(Difco)社製O128:B8]の物性は次の通りであった。但し、分子量は後記製造例4に記載のSDS-PAGE法

によって測定した。

大腸菌LPSの物性

主要分子量=40,000±10,000

8,000±4,000

リン数=12/分子量3万

ヘキサミン数=45±6/分子量3万

脂肪酸数=18/分子量3万

KDO数=5±1/分子量3万

【0017】製造例4

①50ml容コーニングチューブに、1.09%の灰分を含む硬質小麦粉（カナダ産の1・カナディアン・ホイート）1.04gを秤量して入れ、20mlの蒸留水を加えて50mg/mlの小麦粉液を調製した。

②この液を37℃の水浴中で振とう培養し、経過時間0時、1時、2時、3時、4時、6時、8時、10時、12時、20時、24時、45時に各0.5mlを採取し、 $10^0 \sim 10^5$ 倍希釈して標準寒天培地（日水製薬社製の培地であり、下記の組成を持つ）に100μl宛をまき込み、生菌数の測定、コロニーの観察を行った。

標準寒天培地（日水製薬社コード番号：05618）

1リットル中 酵母エキス 2.5g

ペプトン 5.0g

ブドウ糖 1.0g

カンテン 15.0g

pH 7.1±0.1

③種類が異なると考えられた、培養経過時間8時間目、10時間目に認められた黄〜クリーム色不透明コロニー（コロニー1）、クリーム色不透明コロニー（コロニー2）、黄色半透明コロニー（コロニー3）、乳白色不透明コロニー（コロニー4）、白色不透明な小さなコロニー（コロニー5）を上記と同種の別の標準寒天培地にまき、植え継ぎ、一方で、コロニー1〜5の細菌のグラム染色性、リムラス活性を調べた。上記コロニーのうち、コロニー4及びコロニー5（共にグラム染色性+）のリムラス活性はコロニー1〜3（共にグラム染色性-）に比べて極めて低かったため、以後の検討から除き、日水製薬社製の培地及びIDテスト・EB-20を使用し、コロニー1〜3の形態、生化学的性状を観察した。次の結果が得られた。

【0018】コロニー1を形成する細菌（識別番号：900814-1）

（通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に平成2年8月17日から微工研菌寄第11664号として国内寄託され、平成3年8月12日より微工研条寄第3509号としてブダペスト条約に従った国際寄託に移管された）以下に記載する形態、生化学的性状に基づき、本細菌は腸内細菌科のセラチア属に属すると推定される。

（a）形態

①短桿状

②運動性なし

③グラム染色性：-

（b）生育状態

①標準寒天培地：黄〜クリーム色で丸形の不透明なコロニーを形成する。

②SS寒天培地：白色で半透明なコロニーを形成する。

〔SS寒天培地：日水製薬社コード番号：05031〕

組成1リットル中 肉エキス 5.0g

胆汁酸塩 9.0g

ペプトン 7.5g

ラクトース 10.0g

クエン酸ナトリウム 8.5g

チオ硫酸ナトリウム 5.5g

クエン酸第二鉄 1.0g

ニュートラルレッド 0.025g

ブリリアントグリーン 0.033g

カンテン 13.5g

pH：7.1±0.1

③TSI寒天培地：斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成する。

〔TSI寒天培地：日水製薬社コード番号：05103〕

組成1リットル中 肉エキス 5.0g

NaCl 5.0g

ペプトン 15.0g

ラクトース 10.0g

シュクロース 10.0g

ブドウ糖 1.0g

クエン酸第二鉄 0.2g

チオ硫酸ナトリウム 0.2g

フェノールレッド 0.02g

カンテン 15.0g

pH：7.6±0.1

（c）生理的性質

①フォーゲス・プロスカウエル反応：+

②インドールの生成：-

③硫化水素の生成：-

④クエン酸の利用：+

⑤ウレアーゼ：-

⑥オキシダーゼ：-

⑦O-Fテスト：+

（d）炭素源の利用性

①ラクトース：+

②アドニット：-

③ラムノース：+

④マンニット：+

⑤エスクリン：+

⑥イノシット：-

⑦ソルビット：+

⑧アラビノース：+

⑨ラフィノース：+

▲10▼シュクロース：＋

(e) その他

- ①リジンの脱炭酸反応：－
- ②マロン酸の利用：－
- ③アルギニンの分解：－
- ④フェニルアラニンの脱アミノ化反応：－
- ⑤オルニチンの脱炭酸反応：－

【0019】コロニー2を形成する細菌（識別番号：900814-2）

（通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に平成2年8月17日から微工研菌寄第11665号として国内寄託され、平成3年8月12日より微工研条寄第3510号としてブダペスト条約に従った国際寄託に移管された）以下に記載する形態、生化学的性状に基づき、本細菌は腸内細菌科のエンテロバクター属に属すると推定される。

(a) 形態

- ①短桿状
- ②運動性なし
- ③グラム染色性：－

(b) 生育状態

- ①標準寒天培地：クリーム色で不透明なコロニーを形成する。
- ②SS寒天培地：赤色で不透明なコロニーを形成する。
- ③TSI寒天培地：斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成する。

(c) 生理的性質

- ①フォーゲス・プロスカウエル反応：＋
- ②インドールの生成：－
- ③硫化水素の生成：－
- ④クエン酸の利用：＋
- ⑤ウレアーゼ：－
- ⑥オキシダーゼ：－
- ⑦O-Fテスト：＋

(d) 炭素源の利用性

- ①ラクトース：＋
- ②アドニット：－
- ③ラムノース：＋
- ④マンニット：＋
- ⑤エスクリン：＋
- ⑥イノシット：－
- ⑦ソルビット：＋
- ⑧アラビノース：＋
- ⑨ラフィノース：＋

▲10▼シュクロース：＋

(e) その他

- ①リジンの脱炭酸反応：－
- ②マロン酸の利用：＋
- ③アルギニンの分解：＋
- ④フェニルアラニンの脱アミノ化反応：－

⑤オルニチンの脱炭酸反応：＋

【0020】コロニー3を形成する細菌（識別番号：900814-3）

（通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に平成2年8月17日から微工研菌寄第11666号として国内寄託され、平成3年8月12日より微工研条寄第3511号としてブダペスト条約に従った国際寄託に移管された）以下に記載する形態、生化学的性状に基づき、本細菌は腸内細菌科のバントエア属に属すると推定される。

(a) 形態

- ①短桿状
- ②運動性なし
- ③グラム染色性：－

(b) 生育状態

- ①標準寒天培地：黄色で丸形の半透明なコロニーを形成する。
- ②SS寒天培地：コロニーを形成しない。
- ③TSI寒天培地：斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成しない。

20 (c) 生理的性質

- ①フォーゲス・プロスカウエル反応：＋
- ②インドールの生成：－
- ③硫化水素の生成：－
- ④クエン酸の利用：＋
- ⑤ウレアーゼ：－
- ⑥オキシダーゼ：－
- ⑦O-Fテスト：＋

(d) 炭素源の利用性

- ①ラクトース：＋
- ②アドニット：－
- ③ラムノース：＋
- ④マンニット：＋
- ⑤エスクリン：＋
- ⑥イノシット：－
- ⑦ソルビット：＋
- ⑧アラビノース：＋
- ⑨ラフィノース：－

▲10▼シュクロース：＋

(e) その他

- 40 ①リジンの脱炭酸反応：－
- ②マロン酸の利用：＋
- ③アルギニンの分解：－
- ④フェニルアラニンの脱アミノ化反応：－
- ⑤オルニチンの脱炭酸反応：－

【0021】④コロニー1、2、3をそれぞれ1リットルのL-肉汁培地に移し、37℃で一夜振とうし、5、000G、4℃で20分間遠心処理して集菌した。なお、このL-肉汁培地は、ディフコ（Difco）社のポリペプトン10g、同社の酵母エキス5g、和光純薬社の特級NaCl（5g）を蒸留水に入れ、NaOHで

27

pH7.5に合わせ、オートクレープし、別途、予め調製済みの和光純薬社の特級グルコースの40%溶液を400倍に希釈して加えて調製したものである。

⑤各菌体をそれぞれ50mlの蒸留水に懸濁し、これに50mlの90%熱フェノールを加えて65~70℃で20分間攪拌し、冷却後に、10,000G、4℃で20分間遠心処理して、水層を回収した。フェノール層を更に2回上記と同一の操作に付した。3つの水層を合わせ、一夜透析してフェノールを除去し、内液を、アドヴァンテック・トーヨー (ADVANTEC TOYO) 社のUK-200を使用して限外濾過に付して分子量20万カッターオフにより濃縮した (N₂ 圧: 2気圧)。

⑥この濃縮サンプルを、ファルマシア社製のQ-セファ

ローズ ファスト フロー (Q-Sepharose * 乾燥収量 - (蛋白量 + 核酸量)

$$\text{純度} = \frac{\text{乾燥収量} - (\text{蛋白量} + \text{核酸量})}{\text{乾燥収量}} \times 100$$

【0023】

【表2】

菌体900814-1

総乾燥収量 (mg)	6.8
LPS (mg)	19.8
糖 (mg)	3.1
蛋白 (μg)	86
核酸 (μg)	<161
純度 (%)	96<

【表3】

菌体900814-2

総乾燥収量 (mg)	10.4
LPS (mg)	75.6
糖 (mg)	2.5
蛋白 (μg)	64
核酸 (μg)	<108
純度 (%)	98<

【表4】

28

* Fast Flow) を使って陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。即ち、10mMトリス-HCl (pH7.5) と10mMのNaClを含む緩衝液で試料をカラムに付した後、400mMNaCl/10mMトリス-HCl (pH7.5) でリムラス活性画分を溶出させた。この溶出液を上記と同じ条件で限外濾過に付して脱塩、濃縮して、純度96%以上のLPSを得た。なお、核酸は1MNaCl/10mMトリス-HCl (pH7.5) で溶出した。

【0022】各菌体の結果は次表2~4の通りであった。核酸量はOD (260nm) での測定値に基づき (1OD=50μg)、純度 (%) は次式に基づき計算した。

【数2】

菌体900814-3

総乾燥収量 (mg)	19.2
LPS (mg)	103.6
糖 (mg)	7.6
蛋白 (μg)	73
核酸 (μg)	<137
純度 (%)	99<

【0024】⑥分子量

- 30 各菌体から得られたLPSを各々蒸留水に溶解して2mg/ml溶液を調製し、その10μlを1.5ml容プラスチックチューブに入れた。これに、別途、180μlの10% (w/v) SDS、45μlの5%β-メルカプトエタノール、90μlのCBB色素溶液、112.5μlの0.5Mトリス塩酸 (pH6.8) 及び22.5μlの蒸留水を加えて調製したSDS処理液10μlを加えてよく混合し、次いで5分間沸騰水浴中に浸した。この加熱後直ちに氷水中に浸して急冷した。10mlの10% (w/v) SDS、17.9gのトリシン及び3.03gのトリスを1リットルの蒸留水に溶解して調製した泳動緩衝液をマリソル社製のスラブゲル電気泳動槽に入れた。20%ポリアクリルアミドゲルを泳動槽に固定し、サンプル溝に検体を入れ、電圧を50vに1時間、次いで、150vに固定して、色素がゲルより溶出するまで泳動を続けた (本明細書においてこの泳動法をSDS-PAGE法と称する)。泳動終了後に、バイオラッド社の銀染色キット161-0443を使い銀染色を室温で行って、挙動を確認した。同時に泳動させた蛋白分子量マーカー [ファルマシア社製のLMWキットE: ホスホリラーゼb (94k)、アルブミン (67

k)、オブアルブミン(43k)、カーボニックアンヒドラーゼ(30k)、トリブシンインヒビター(20k)、 α -ラクトアルブミン(14k)]、ペプチド分子量マーカー[ファルマシア社製の1860-101分子量マーカー:ミオグロビン(16.9k)、ミオグロビンI&II(14.4k)、ミオグロビンI(8.2k)、ミオグロビンII(6.0k)、ミオグロビンIV(2.5k)]の泳動位置からLPSの分子量を計算したら、5,000 \pm 1,000(菌体900814-1に由来するLPS1)、6,500 \pm 2,500(菌体900814-2に由来するLPS2及び菌体900814-3に由来するLPS3)であった。上記銀染色におけるLPS1、LPS2、LPS3の染色帯を図4に示す。図4において、番号1~3がそれぞれLPS1~3に対応する。図4に示されるように、LPS1は分子量3万付近にもややまとまった染色帯を示した。LPS2は30,000から43,000の間にも染色帯が認められるが、14,000以下の染色帯の染色度と比較すると、高分子のものは極めて少ないと推定される。後述する糖量、ヘキソサミン量から判断しても、LPS2は最も糖含有率が低く、ついでLPS3、LPS1の順で高くなり、電気泳動で観察されたパターンと一致すると考えられる。又、LPS量/総乾燥収量の比もLPS2、LPS3、LPS1の順に低くなっている。以上の観察結果から、LPS2は比較的低分子のLPSが多く、次いで、LPS3、LPS1の順にその割合は少なくなると推定される。

【0025】⑦リン含有量

チェントリバラ(Chen-Toribara)法

[チェン等著、「アナリティカル ケミストリ(Ana*30

$$\text{リン量(重量\%)} = \frac{\text{サンプル吸光度}}{0.67 \times (\text{サンプル濃度}) \times 0.05}$$

リン数は、次式により計算した、分子量5,000当たりの換算数である。

【数4】

$$\text{リン数} = \frac{\text{リン量(重量\%)}}{100} \times \frac{5,000}{31}$$

※

LPS	吸光度	リン量(μ g)	リン量(重量%)	リン数
1	0.36	0.54	1.7	2 \pm 1
2	0.31	0.46	0.8	1~2
3	0.87	1.30	1.3	2 \pm 1

【0027】⑧ヘキソサミン含有量

エルソン-モルガン(Elson-Morgan)法

(東京化学同人出版「生化学実験講座」No. 4の37 50

*lytical Chemistry)、vol. 2

8、1756~1758頁(1956年)に準拠して次の通りに行った。LPS1、LPS2、LPS3を各別に蒸留水に溶解して、それぞれ、31.6 μ g、57.6 μ g、103.6 μ gのLPSを含む20 μ lの溶液を調製し、小試験管に入れた。20 μ lの50v/v%硫酸を添加し、160 $^{\circ}$ Cで2時間加熱した。次いで、20 μ lの10v/v%過塩素酸を添加した後にガスバーナーで1分間加熱して灰化させた。その後に0.5mlの蒸留水、次いで0.5mlの反応試薬(1mlの6N硫酸、2mlの蒸留水、2mlの2.5v/w%モリブデン酸アンモニウム及び1mlの10v/w%のアスコルビン酸を混合して調製し、その0.5mlを使用)を添加して室温で30分間放置した後に、820nmでの吸光度OD(820nm)を測定した。なお、検量線作成用の試料としては、リン酸二水素カリウム(和光純薬社製)を蒸留水で希釈し、リン酸重量としてそれぞれ2.5 μ g、1 μ g、0.25 μ g、0 μ gを含む0.5mlの溶液を調製して使用した。なお、リン1gはリン酸二水素カリウム4.39gに相当する。結果を次表5に示す。なお、吸光度を示す数値は、無機リンの混入(例えば、リン酸緩衝液に由来する)による誤差を避けるために、加熱処理をしていない対照のデータを減じた値である。リン量(μ g)は吸光度から計算された値である。リン量(重量%)は、次式により計算した。なお、式中の「0.67」は、標準のリン1 μ gのOD値を指し、サンプル濃度は、蒸留水に溶解した各LPSの濃度(mg/ml)を指す。

【数3】

サンプル吸光度

※【0026】

【表5】

7~379頁)に準拠して次の通りに行った。LPSを蒸留水に溶解して1.58mg(LPS1)、2.88mg(LPS2)、5.18mg(LPS3)/mlの

溶液を調製し、その100 μ lをスクリーキャップ付きスピッツ（イワキガラス社製）に入れ、これに100 μ lの8NHC1を添加して110℃で16時間加熱した。4NNaOHを約200 μ l添加してpH7とした。その100 μ lを分取し、別のスクリーキャップ付きスピッツに入れ、200 μ lの下記試薬Aを加えた後に、105℃で1.5時間加熱し、次いで流水で冷却した。次いで、100 μ lを分取し、670 μ lの96%エタノールを加え、更に、67 μ lの下記試薬Bを加えた後に室温で1時間放置し、535nmで吸光度を測定した。検量線作製用試料としては0.20~200 μ g/mlのN-アセチル グルコサミン（和光純薬社製）を使った。

（試薬A）75 μ lのアセチルアセトンと2.5mlの1.25N炭酸ナトリウムを混合して調製した。

（試薬B）1.6gのp-ジメチルベンズアルデヒドと30mlの濃塩酸と30mlの96%エタノールを混合して調製した。

結果、LPS1、LPS2、LPS3のヘキシサミン数は各々9 \pm 1/分子量5,000、7 \pm 1/分子量5,000、5 \pm 1/分子量5,000だった。

【0028】⑨KDO含有量

KDO（2-ケト-3-デオキシオクトネート）含有量をジフェニルアミン法〔シャビーアール（Shaby R.）等著、アナリティカル バイオケム（Analytical Biochem.）、58（1）、123~129頁（1974年）〕に準拠して次の通りに行った。500mgのジフェニルアミン、5mlのエタノール、45mlの氷酢酸、50mlの濃塩酸（全て和光純薬社製）を合わせてKDO検出試薬を調製した。その500 μ lに、（1）0.505mg/mlのLPS1を*

$$y = x \times 10^{-6} \times \frac{5,000}{0.505 \times 10^{-3}} = 2.19$$

【0029】以下は、本発明のLPSを含む製剤の処方例である。なお、実施例2~5におけるLPS量は、リムラステストによる大腸菌LPS換算量である。

実施例2（錠剤）

小麦LPS	0.04g
6%HPC乳糖	178g
ステアリン酸タルク	8g
バレイショデンプン	14g

以上を混和し、打錠して、0.1mgの小麦LPSを含む0.5gの錠剤400個を調製した。

実施例3（内用液剤）

クロレラLPS	1mg
精製水	100ml

実施例4（軟膏剤）

*含む250 μ l蒸留水溶液；（2）0.576mg/mlのLPS2を含む250 μ l蒸留水溶液；（3）0.518mg/mlのLPS3を含む250 μ l蒸留水溶液；のいずれかを合わせ、100℃の沸騰水浴中で33分間加熱後に冷水（24.5℃）中で30分間冷却し、ついで日立分光光度計320を使い420、470、630、650nmでの紫外外部吸収を測定した（測定値を各々A420、A470、A630、A650とする）。標準試料としては、0.5 μ mol/mlのKDOアンモニウム塩〔米国シグマ（Sigma）社製〕を含む蒸留水250 μ lを使用した。検体試料、標準試料それぞれについて、次式の値を求めた。

$$S = A420 - A470 + A630 - A650$$

検体試料の値（S_T）はLPS1で0.109、LPS2で0.078、LPS3で0.099であった。標準試料の値（S_s）は0.246であり、蒸留水のみの値は0.005であった。この値の比較により、LPS1には2 \pm 1/分子量5,000、LPS2には1~2/分子量5,000、LPS3には2 \pm 1/分子量5,000のKDOが含まれると推定された。なお、これらの値は、LPS1を例にとると、次のように計算される。溶液に含まれるKDDの濃度をx（ μ mol/ml）とすると、

【数5】

$$\frac{0.5}{0.246} = \frac{x}{0.109}$$

上記式から、x=0.221となる。従って、LPS1の1mol（5,000と仮定）に含まれるKDDのmol数をyとすると、次式により、y=2.19となる。

【数6】

LPS1	0.1g
精製ラノリン	80g
黄色ワセリン	適量
	1000g

実施例5（注射剤）

LPS3	0.5mg
注射用蒸留水	適量
合計	1000ml

【0030】実験例1（リムラステスト陽性植物LPSの定量）

各種植物に含まれるリムラステスト陽性LPSの定量を、生化学工業株式会社のトキシカラーシステムを使って行った。

①96穴の平底または丸底プレートに注射用蒸留水を1穴当たり180 μ l入れた。試料20 μ l（試料が固体の場合には注射用蒸留水に溶解して調製した）をプレー

トの穴の1つに加えた。プレートミキサーで攪拌しながらピペティングを行って10倍希釈液を調製した。

(以後、順次希釈試料を20 μ lずつとり、同様に処理することで100倍、1000倍、…と10倍希釈系列液を調製できる。また、注射用蒸留水と試料の量比を変えることにより希釈率は任意に設定できる。)

②内部標準として1.5 μ g/mlの大腸菌LPS溶液の100,000倍希釈液を調製し、希釈やリムラステスト発色が正常であることを確認した。

③上記①の10倍希釈液35 μ lを別のプレートの穴にとり、生化学工業株式会社のトキシカラーシステムのLS-1セット35 μ lを添加し、37℃で30分間放置した。ついで105 μ lの1M酢酸水を加えて攪拌して反応を停止させた。この試料液の波長415nmでの吸光度を、96穴用吸光度計プレートリーダーMTP-100(コロナ電気株式会社製)で測定した。バックグラウンドとしては蒸留水を、検量線作成用としては42 μ g/mlの生化学工業株式会社のトキシカラーシステムの

ET-1セットを使用して検量線を作成し、この検量線を基準にして各試料中のリムラステスト陽性LPSの定量を行った。(試料が蒸留水である場合の吸光度を0とした。)なお、この方法で前記LS-1セットを使用した場合には10~45 μ g/mlの範囲内で発色に定量性があることが確認されたので、この範囲に入らないときは、希釈率を変えて再実験した。希釈試料の定量値は、

(検量線から読み取った値) × (希釈率)

で計算した。得られた結果を、固体試料の場合にはng/g単位で、液体試料の場合にはng/ml単位で次表6に示す。なお、表中の試料の欄の会社名、地名等は、当該試料の入手先、産地をさす。かかる記載がない品はスーパーストアー忠実屋の神奈川県津久井郡中野町店で購入した品で、製造者が不明なものを指す。なお、「ホクレン」は、北海道農業協同組合連合会の略称である。

【表6】

リムラステスト陽性

<u>試料(固体)</u>	<u>LPS量 (ng)</u>
<u>裸子植物</u>	
松の実(興南貿易)	125
<u>単子葉類</u>	
硬質系小麦種子(千葉製粉)	2,250
硬質系小麦種子(千葉製粉)	
(分子量5000以上)	1,000,000
硬質系小麦粉(千葉製粉)	7,500
小麦ふすま(千葉製粉)	
(分子量5000以上)	300
小麦胚芽(千葉製粉)	1,600
小麦胚芽(千葉製粉)	
(分子量5000以上)	<10,000
玄米	1,100
米粉(日の本穀粉)	
(分子量5000以上)	31,000,000
米ぬか	29,000
米ぬか(分子量5000以上)	500,000
コーンフラワー(大洋飼料)	
(分子量5000以上)	<0.3
コーングリッツ(大洋飼料)	
(分子量5000以上)	120
コーン(和光食糧)	200
クマ笹(関本物産)	15,000
アヤメ(種子)	3,300
ニンニク(鱗茎)	70
アスパラガス(芽)	4,500

ミョウガ（花房）	37	41,000	
ヨクイニン（ウチダ和漢薬）		2,300	
（原植物は鳩麦）			
ハンゲ（松浦薬業）		5,500	
（原植物はカラスビシャク）			
バクモントウ（橋本天梅堂）		4,000	
（原植物はジャノヒゲ）			
ターメリック（エスビー食品）	195,000		10
（原植物はウコン）			
<u>双子葉類</u>			
大豆（三友食品）		150	
大豆（ホクレン）（分子量5000以上）		400	
丹波黒大豆（和光食糧）		85	
小豆（和光食糧）		450	
小豆（和光食糧）			
（分子量5000以上）	36,000,000		20
ひたし豆（和光食糧）		800	
大正金時（和光食糧）		550	
大福豆（和光食糧）		350	
そら豆（生）		750	
ジャガイモ（ホクレン）			
（分子量5000以上）		<0.3	
ビワ（種子）		800	
アボガド（種子）		950	30
モモ（種子）		4,500	
クルミ（種子）		1,900	
ソラ豆（種子）		750	
カボチャ（種子）		10,000	
トマト（生の実）		10,500	

39	
カイワレダイコン（根を除く）	50,000
マタタビ（丸久物産）	40,000
アマチャズル（K. K. 桜井）	73,000
ドクダミ（湿潤重量当たり）	
（帝京大学薬用植物園）	1,200
胡椒（白）（エスピー食品）	2,300
トウガラシ（興南貿易）	2,300
八角（興南貿易）	5,500
ナツメグ（ライオン）	2,000
（原植物はニクズク）	
トウヒ（ウチダ和漢薬）	8,000
（原植物はダイダイ）	
カッコン（橋本天海堂）	3,000
（原植物はクズ）	
ナンキンカンゾウ（ウチダ和漢薬）	18,000
オタネニンジン（ウチダ和漢薬）	45,000
ボウフウ（橋本天海堂）	50,000
カンボウイ（橋本天海堂）	600,000
（原植物はオオツツラフジ）	
チョウトウコウ（ウチダ和漢薬）	7,000
（原植物はウンカリア・ヒルスタ）	
八味地黄丸（カネボウ薬品）	17,000
小柴胡湯（ツムラ）	13,000
五苓湯（ツムラ）	12,000
猪苓湯（ツムラ）	14,000
十全大補湯（ツムラ）	8,000
八味地黄丸（ツムラ）	8,000
ローヤルゼリー	1,000
[バキン ローヤル ゼリー (Pekin Royal Jelly)]	

ハチミツ（加藤美峰園本舗） ⁴¹	800
<u>シダ植物</u>	
スギナ（溼潤重量当たり）	700
（帝京大学薬用植物園）	
ゼンマイ（関本物産）	10,000
<u>ソウ類</u>	
わかめ（三陸天然品）	11,000
わかめ芽株（森谷健康食品）	200,000
ひじき（生）	85,000
芽ひじき（小善本店）	105,000
コブ（ヤマトタカハシ）	235,000
アサクサノリ（乾燥生ノリ）	130,000
クロレラ	
（関ヘルスタージャパンYS）	1,900,000
クロレラ	
（備マンナンフーズYS）	1,000,000
<u>菌類</u>	
椎茸（下仁田産）	16,000
えのき茸（長野県中野市）	20,000
しめじ（野多郡宮城町）	40,000
まいたけ（大利根）	205,000
あわび茸（羽生）	8,000
マッシュルーム	20,000
さくらげ	75,000
ナメコ	21,000
エビオス（アサヒビール社製 ビール酵母）	250,000
冬虫夏草	240,000
<u>その他</u>	

雪印ナチュレヨーグルト（特雪印） ⁴²	5,000
グリコビフィズスヨーグルト（特グリコ）	50
	リムラステスト陽性
<u>試料（液体）</u>	<u>LPS量（ng）</u>
<u>ビール</u>	
キリン ファインピルスナー	1,150
ラガービール	1,250
ハートランド	1,550
ファインドラフト	1,400
アサヒ スーパーイースト	600
<u>ワイン</u>	
サントリー サントネージュ（白）	13
（赤）	24
シードル（アップル）	900
<u>日本酒</u>	
大関一級（大関酒造）	2.4
黄桜二級（黄桜酒造）	1.7
大衆吟醸二級（玉泉堂酒造）	2.1
<u>玄米酒</u>	
日々一献（大関酒造）	12
<u>薬味酒</u>	
陶陶酒デルカップ（陶陶酒本舗）	1.2
<u>焼酎</u>	
宝焼酎（宝酒造）	<2.0
<u>その他</u>	
キョーレオピン（湧永製薬）	600
ニンニク抽出液（湧永製薬）	350
グロスキュー（クロレラ工業）	6,000

10

20

30

43	大麦健康メッコール（韓国・一和）	2,000
	サクロンハーブ液（エーザイ）	1,000
	ヘチマ水（自家製）	700
	バイオアルゲン（クロレラ工業）	400
	バンシロン内服液（ロート製薬）	200
	ユンケルファンティー（佐藤製薬）	50
	コリホグス（小林製薬）	30
	ツディ（三共）	20
	ミオDコーワ100（コーワ）	10
	リゲイン（三共）	9
	ロブレン50（第一製薬）	7
	ソルマック（大腸製薬）	6
	ローゼリーゴールド（中外製薬）	5
	バスビタン30（常盤製薬）	5
	チオビタ（大腸製薬）	5未満
	リボビタン（大正製薬）	5未満
	アスバラゴールド（田辺製薬）	5未満

44

【0031】実験例2（マクロファージのインビトロTNF産生能を活性化する際のED₅₀を与えるリムラステスト陽性LPSの含有量が0.4~100ng/培養液mlであるLPSの選択方法）

9週齢の、平均体重29gの各群3匹のオスのC3H/Heマウスのマクロファージ腹腔常在細胞200μl（2×10⁵個）/穴を96穴の平底プレートに入れ、プライマーとしての組換えマウスIFN-γ（100単位/ml）を各穴に10μl宛加えた。別途、各種LPS源を65℃の熱水（g/ml）で5時間抽出して調製した抽出液を各種希釈し、その10μl/穴をプライマー投与の3時間後にトリガーとして加えた。2時間培養後に遠心分離操作に付した（3000G、20分）。各穴から得られた130μlの、TNF活性はL929細胞に対する毒性に基づいて測定し、又、リムラステスト陽性LPS含有量は生化学工業株式会社のトキシカラーシステムを使用して測定した。測定値を、縦軸にTNF産生量（単位/培養液ml）を、横軸（対数尺）に対応リムラステスト陽性LPS含有量（ng/培養液ml）を表す座標にプロットし、プロットされた各点から推定されるシグモイド曲線を描いた。トリガーを投与しなかった場合のTNF産生量を与える各トリガーのマクロファージ活性化能を0%とし、トリガー投与の効果として増大するTNF産生量が最大恒量に達したときの各トリ

ガーのマクロファージ活性化能を100%とし、その50%に相当するマクロファージ活性化能を与えるリムラステスト陽性LPS含有量を曲線から読み取った。マクロファージ活性化能とリムラステスト陽性LPS含有量との相関関係が上記条件を満たしたLPS採取源の結果を表7に示す。表中で、「TNF」はTNF産生量（単位/培養液ml）を、「活性化能」はマクロファージ活性化能（%）を、「LPS」はリムラステスト陽性LPS含有量（ng/培養液ml）を表す。なお、トリガー無添加時のTNF産生量は0.75単位/mlであったので、TNF産生量が0.75単位/ml以下である場合をマクロファージ活性化能0%とし、マクロファージ活性化能（%）は次式により計算した。

【数7】

$$\frac{\text{TNF産生量} - 0.75}{\text{TNF産生最大恒量} - 0.75} \times 100$$

【表7】

50

45

46

L P S 源	T N F	活性化能	L P S
ターメリック	0.75	0	0
	3.9	9	0.6
	36.3	100	60
	36.3	100	>1000
カンボイ	0.75	0	0
	40.7	100	4
	36.5	90	400
	40.7	100	>1000
コンブ	0.75	0	0
	1.3	4	0.8
	13.0	100	80
	13.0	100	>1000
アサクサノリ	0.75	0	0
	1.0	2	0.3
	12.8	100	30
	12.8	100	>1000
ワカメ芽株エキス	0.75	0	0
	1.3	4	0.2
	15.5	100	20
	15.5	100	>1000
芽ヒジキ	0.75	0	0
	5.7	8	0.7
	62.7	100	70
	62.7	100	>1000
エビオス	0.75	0	0
	0.6	0	0.7

*

10

20

30

	30.6	100	70
	30.6	100	>1000
冬虫夏草	0.75	0	0
	2.0	4	0.4
	30.3	100	40
	30.3	100	>1000
ワカメ芽株	0.75	0	0
	0.9	1	0.4
	22.7	100	40
	22.7	100	>1000
クロレラ	0.75	0	0
	39.2	100	9.6
	35.0	89	960
大腸菌 L P S	0.75	0	0
	3.6	27	2
	10.2	89	20
	11.4	100	200
	10.9	95	2000
小麦 L P S	0.75	0	0
	0.7	0	2
	10.1	89	21
	10.2	100	210
	8.5	82	2100
百日咳菌 L P S	0.75	0	0
	0.7	0	11
	3.3	55	110
	5.4	100	1100
リビド A	0.75	0	0
	4.7	37	2

*

9.4	80	24
11.1	96	240
11.5	100	2400

表7に示された結果を図5～8に示す。図5～8において、縦軸はマクロファージ活性化能(%)を表し、横軸(対数尺)はリムラスト陽性LPS含有量($\text{ng}/\text{培養液ml}$)を表している。図5において、○はターメリックの、●はカンボイの、□はコンブの、▲黒四角▼はアサクサノリのデータを示す。図6において、○は

ワカメ芽株エキスの、□は芽ヒジキの、▲黒四角▼はエビオスのデータを示す。図7において、○は冬虫夏草の、●はワカメ芽株の、□はクロレラのデータを示す。図8において、○は大腸菌LPSの、●は小麦LPSの、□は百日咳菌LPSの、▲黒四角▼はリピドAのデータを示す。

【0032】実験例3（実験動物での鎮痛効果—その1）

①8週齢の各群6匹のC3H/He雄マウス（体重20～25g）に、重量で0、 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} 、1、 $10\mu\text{g}$ /匹ずつの本発明のLPS（製造例1で生産された小麦LPS）を生理的食塩水*

*0.2mlに溶解して静注した。その3時間後に0.5mlの1%酢酸を腹腔内投与し、30分間にわたり、各マウスの身もだえ回数（各群6匹の平均）を計数し、次表8に示す結果を得た。表中、「身もだえ阻止率（%）」は、次式により計算した。

$$\left(1 - \frac{\text{各投与量における身もだえ数}}{\text{投与量0の場合の身もだえ数}}\right) \times 100$$

【表8】

10

投与量 (μg /匹)	身もだえ数	身もだえ阻止率 (%)
0	33	0
10^{-4}	27	18
10^{-3}	23	30
10^{-2}	16	52
10^{-1}	17	48
1	4	88
10	4	88

両側t検定により、 $10^{-2}\mu\text{g}$ /匹以上の投与量であれば危険率1%以下で、 $1\mu\text{g}$ /匹以上の投与量であれば危険率0.1%以下で、有意な鎮痛効果があると判断された。図9は、表7に示された「身もだえ阻止率」

（図中、○で示す）と、大腸菌LPS（米国ディフコ社製0128:B8）の身もだえ阻止率（図中、●で示す）とをグラフにしたものである。大腸菌LPSのデータは、その $10\mu\text{g}$ /匹を投与したときの平均身もだえ数1、対照群での平均身もだえ数24に基づいて計算された身もだえ阻止率96%を示している。このグラフから明らかな通り、本発明のLPSを重量で $1\mu\text{g}$ /匹以上投与すると、酢酸に起因する身もだえは、その約90%が阻止された。

②8週齢の各群6匹のC3H/He雄マウス（体重20※

※～25g）に次の薬剤を投与した。

投与群A：重量で $1\mu\text{g}$ /匹のLPS（製造例1で生産された小麦LPS）を生理的食塩水0.2mlに溶解して調製した静注液

投与群B： 1mg /匹の既知鎮痛剤フェニルブタゾンに1%CMC水溶液0.2mlに溶解して調製した静注液
投与群C：生理的食塩水0.2ml

薬剤投与の0.5時間、1.5時間、3時間、8時間又は18時間経過後に、0.5mlの1%酢酸を腹腔内投与し、30分間にわたり、各マウスの身もだえ回数（各群6匹の平均）を計数し、次表9に示す結果を得た。表中、「身もだえ阻止率（%）」は、次式により計算した。

$$\left(1 - \frac{\text{各投与群における身もだえ数}}{\text{投与群Cの場合の身もだえ数}}\right) \times 100$$

上記式で、「投与群Cの場合の身もだえ数」は、生理的食塩水投与の30分後に酢酸を投与し、30分間にわたって計数した場合の身もだえ数であり、投与群Aに対し

ては39、投与群Bに対しては35であることが観察された。

【表9】

経時数	身もだえ数【身もだえ阻止率(%)】	
	投与群A	投与群B
0.5	20(49)	18(49)
1.5	7(82)	7(80)
3	9(77)	25(29)
8	26(33)	測定せず
18	25(36)	測定せず

図10は、表9に示された「身もだえ阻止率」をグラフにしたものである。図中、○は投与群Aの、●は投与群Bのデータを示す。表9及び図10に示された結果から明らかな通り、本発明のLPSはフェニルブタゾンの千分の1という驚異的な少量でフェニルブタゾンに優るとも劣らない鎮痛効果を発揮し、効果発現に要する時間も同程度である。更に、両側t検定で危険率5%以下とした場合、本発明のLPSの場合には、投与後8～18時間経過しても有意な鎮痛効果を維持しているが、フェニルブタゾンの場合には、投与後3時間経過すると有意な鎮痛効果は示さないと判断された。即ち、本発明のLPSの鎮痛効果は、フェニルブタゾンに比して、極めて長く持続すると言える。

*【0033】実験例4(実験動物での鎮痛効果—その2)

7～10週齢の各群5匹のC3H/He雄マウス(平均体重約28g)に、LPS換算でそれぞれ0、1、5、25、400 μ g/匹ずつのLPS3或いは大腸菌LPSを含むように調製した200 μ lの蒸留水をゾンデで経口投与した。その1.5時間後に500 μ lの0.7%酢酸を5分かけて腹腔内投与し、その後30分間にわたり、各マウスの身もだえ回数を計数し、表10に示す結果が得られた(各群5匹の平均)。表中、「—」は該当量では測定しなかったことを示す。又、「身もだえ阻止率(%)」は、次式により計算した。

*【数10】

$$\left(1 - \frac{\text{各投与量での身もだえ数} - \text{投与量}400\mu\text{gでの身もだえ数}}{\text{投与量}0\text{での身もだえ数} - \text{投与量}400\mu\text{gでの身もだえ数}}\right) \times 100$$

【表10】

LPS投与量 (μ g/匹)	LPS3		大腸菌LPS	
	身もだえ数	身もだえ阻止率 (%)	身もだえ数	身もだえ阻止率 (%)
0	18	0	20	0
1	17	10	18	82
5	10	80	—	—
25	7	110	13	64
400	8	100	9	100

【0034】実験例5(実験動物での鎮痛効果—その3)

7週齢の各群6匹のC3H/He雄マウス(平均体重約23g)に、LPS換算でそれぞれ1 μ g/匹ずつのA. ラデイオバクターLPS、LPS3或いは大腸菌LPSを含むように調製した200 μ lの生理的食塩水を静注した。対照群には生理的食塩水のみを投与した。その1.5時間後に500 μ lの1%酢酸を5分かけて腹

腔内投与し、その後30分間にわたり、各マウスの身もだえ回数を計数した。結果、各群6匹の平均として、対照群では17回の身もだえが観察されたが、LPS投与群ではいずれも対照群における半分以下である8回の身もだえしか観察されなかった。

【0035】実験例6(実験動物での鎮痛効果—その4)

8週齢の各群5匹のC3H/He雄マウス(平均体重約

29 g) に、LPS換算でそれぞれ0 μ g、0.7 μ g、3.5 μ g、17.5 μ g/匹の製造例1で製造された粉末A-a₂ 含むように調製した200 μ lの蒸留水をゾンデで経口投与した。その1.5時間後に500 μ lの0.7%酢酸を5分かけて腹腔内投与し、その後30分間にわたり、各マウスの身もだえ回数を計数し、*

各投与量での身もだえ数-投与量17.5 μ gでの身もだえ数

$$(1 - \frac{\text{投与量0での身もだえ数-投与量17.5 } \mu\text{gでの身もだえ数}}{\text{投与量0での身もだえ数}}) \times 100$$

【表11】

LPS投与量 (μ g/匹)	粉末A-a ₂	
	身もだえ数	身もだえ阻止率 (%)
0	18	0
0.7	11	64
3.5	7	100
17.5	7	100

図11は表10、表11に示した結果をグラフ化したものである。図11より、LPS3、粉末A-a₂、大腸菌LPSの身もだえ阻止率ED₅₀ はそれぞれ2.8 μ g/匹、0.46 μ g/匹、17 μ g/匹と推定され、従って、大腸菌LPSに比べ、LPS3は約6倍の、粉末A-a₂ は約36倍の鎮痛効果があると推定される。

【0036】実験例7（臨床での鎮痛効果）

患者A（女性、年令41才）

〔1986年〕異性との性交渉によりHIV（ヒト免疫不全ウイルス）に感染。〔1990年8月〕ARC（エイズ関連症候群）

p24抗体：+

〔1990年8月20日〕400mg/日のAZT（アジトチミジン）投与開始。〔同年9月28日〕左大腿部の2箇所が発疹確認。〔同年10月4日〕左臀部から左大腿部、左ふくらはぎにまでVZV（水痘・帯状疱疹）拡大。〔同月5日〕入院。

白血球数：4000

C反応性蛋白：0.25

T4細胞数：196

痛み：+++

製造例1で生産された粉末A-a₂ を1mg/ml（リムラステスト陽性LPS量で1 μ g/ml）含む50w/v%グリセリン液（グリセリン：水=1：1）（以下、この液を「薬剤A」と称す）を1日1回40mlずつをVZV部位に直接塗付するとともに、1日3回1mlずつを経口投与した。この間、他薬剤は投与しなかつ

*表11に示す結果が得られた（各群5匹の平均）。表中、「-」は該当量では測定しなかったことを示す。又、「身もだえ阻止率(%)」は、次式により計算した。

【数11】

10 た。その結果、塗付数時間後に痛みは劇的に消失し、発疹も約1週間でほぼ消失した。

【0037】投与量、投与間隔、毒性値

本発明のLPSを鎮痛剤、動物用鎮痛剤として投与するさいの量、投与間隔は、当然、担当医師或いは獣医師の厳重な管理下、投与対象の年齢、症状、体重、投与効果を勘案して個別に決定されるが、人間の成人（60kg）で、経口投与で1 μ g~100mg、静脈投与で10ng~10mg、経皮投与で100ng~1mgが1日1回の投与量の一応の目安となる。なお、動物では、牛、馬等の大型動物は上記の量の60分の1を体重1kg当たりの量の目安とし、豚、犬、猫等の中型、小型の動物ではその2倍量を体重1kg当たりの量の目安とし、鶏等の鳥類では更にその2倍量を体重1kg当たりの量の目安とし投与できる。なお、ベーレンス ケルバー（Behrens K

ä

erber）法により測定した、7週齢の平均体重22gのC3H/He雄マウスにおけるLPS1、LPS2、LPS3のLD₅₀ はそれぞれ150、180、180 μ g/匹であり、大腸菌LPS〔米国ディフコ（Difco）社製0128:B8〕の値300 μ g/匹の60%以下であった。又、小麦LPS（製造例1）、大腸菌LPS（同上）、百日咳菌LPS（製造例3）の毒性値LD₅₀ （1群2匹の雄BALB/Cマウス、平均体重45g、における平均値）は静脈内投与でそれぞれ3.2、3.4、11mg/kgであり、皮内投与でそれぞれ16、16、32mg/kgだった。

【0038】

【発明の効果】本発明により、化学治療係数が高く、持続時間が長く、生産コストが低く、しかも、経口、経皮、注射のいずれの経路でもで投与可能な、大量に供給可能な鎮痛剤、動物用鎮痛剤が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】小麦LPSをガスクロマトグラフィーにかけて得られる、分子中における脂肪酸の存在を示すピークを図示したチャートである。

【図2】大腸菌LPSをガスクロマトグラフィーにかけて得られる、分子中における脂肪酸の存在を示すピークを図示したチャートである。

【図3】百日咳菌LPSをガスクロマトグラフィーにか

けて得られる、分子中における脂肪酸の存在を示すピークを図示したチャートである。

【図4】LPS 1、LPS 2、LPS 3の、SDS-PAGE法におけるパターンを示す図である。

【図5】マクロファージ活性化能とリムラステスト陽性LPS含有量との相関関係が本発明の条件を満たしている各種LPSの当該相関関係を示すグラフである。

【図6】マクロファージ活性化能とリムラステスト陽性LPS含有量との相関関係が本発明の条件を満たしている各種LPSの当該相関関係を示すグラフである。

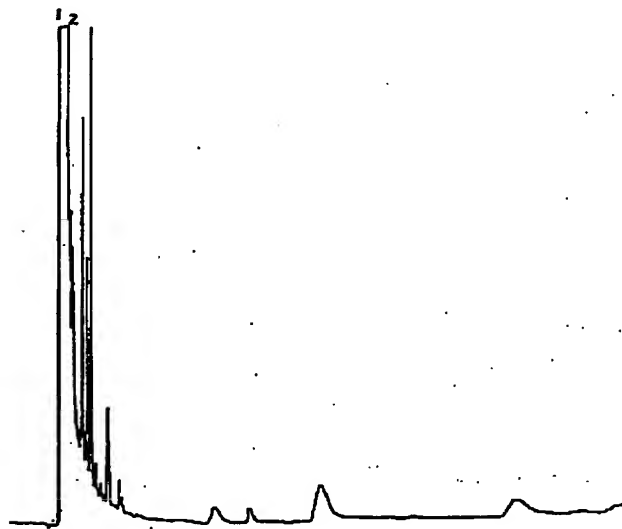
【図7】マクロファージ活性化能とリムラステスト陽性LPS含有量との相関関係が本発明の条件を満たしている各種LPSの当該相関関係を示すグラフである。

【図8】マクロファージ活性化能とリムラステスト陽性LPS含有量との相関関係が本発明の条件を満たしている各種LPSの当該相関関係を示すグラフである。

【図9】本発明のLPSの鎮痛効果の用量-応答曲線を示すグラフである。

【図10】本発明のLPSの鎮痛効果を、既知鎮痛剤フェニルブタゾンの鎮痛効果との比較で表すグラフである。

【図1】

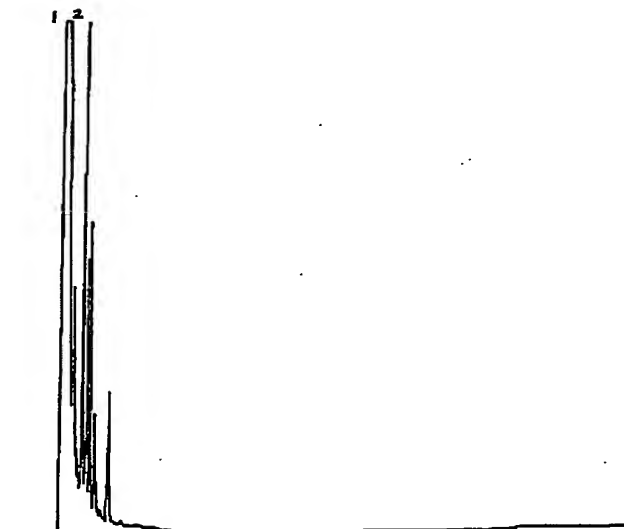


* 【図11】本発明のLPSの鎮痛効果を示すグラフである。

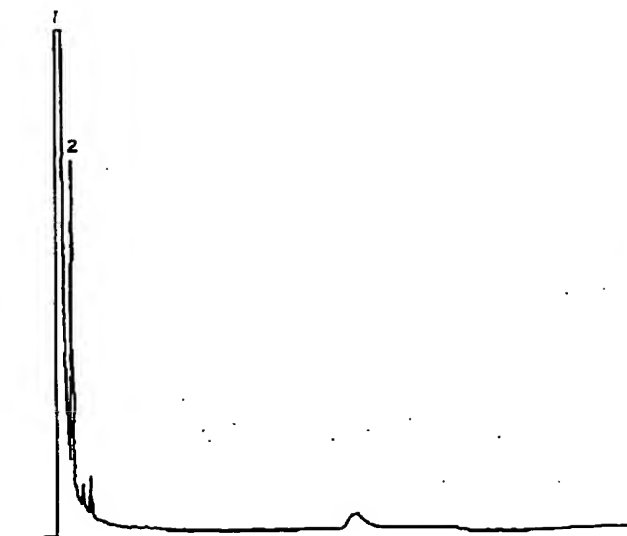
【符号の説明】

図4において、1はLPS 1の、2はLPS 2の、3はLPS 3のパターンを示す。図5～図8において、縦軸はマクロファージ活性化能(%)を表し、横軸(対数尺)はリムラステスト陽性LPS含有量($\text{ng}/\text{培養液 ml}$)を表す。図5において、○はターメリックの、●はカンボイの、□はコンブの、▲黒四角▼はアサクサノリのデータを示す。図6において、○はワカメ芽株エキスの、●は芽ヒジキの、□はエビオスのデータを示す。図7において、○は冬虫夏草の、●はワカメ芽株の、□はクロレラのデータを示す。図8において、○は大腸菌LPSの、●は小麦LPSの、□は百日咳菌LPSの、▲黒四角▼はリピドAのデータを示す。図9において、○は小麦LPSの、●は大腸菌LPSのデータを示す。図10図において、○は小麦LPSの、●はフェニルブタゾンのデータを示す。図11において、□はLPS 3の、●は粉末A-a₂の、○は大腸菌LPSのデータを示す。

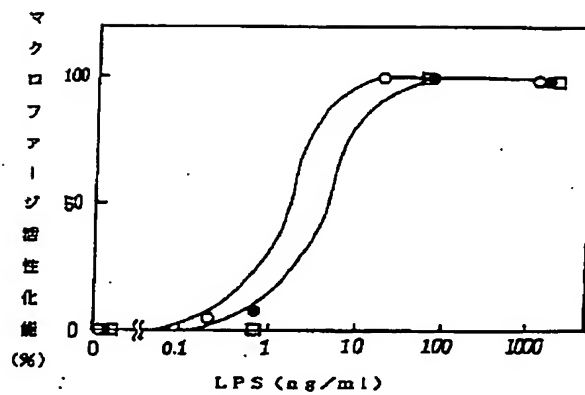
【図2】



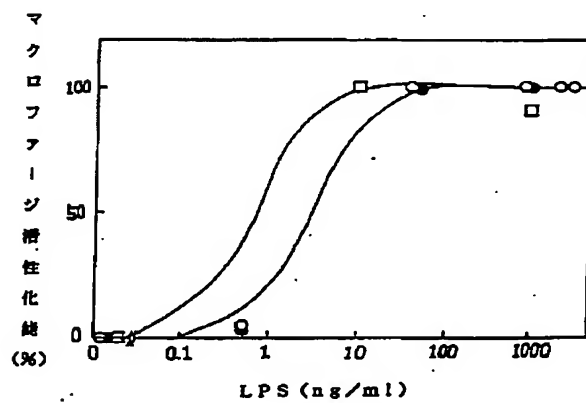
【図3】



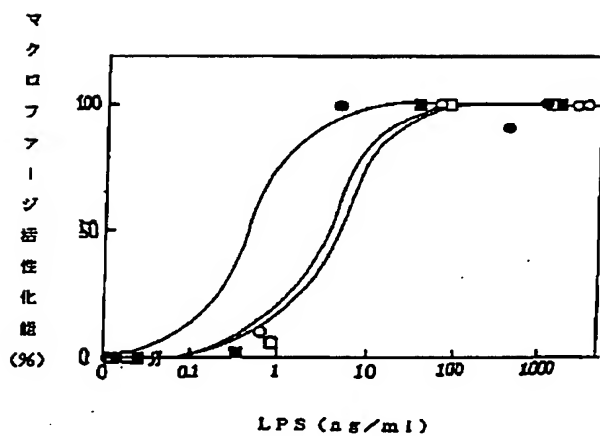
【図6】



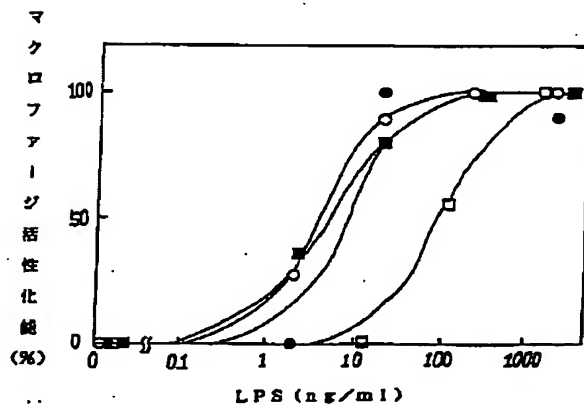
【図7】



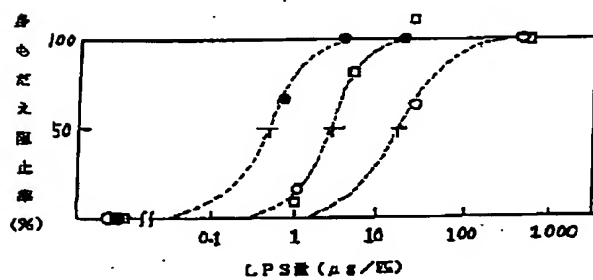
【図5】



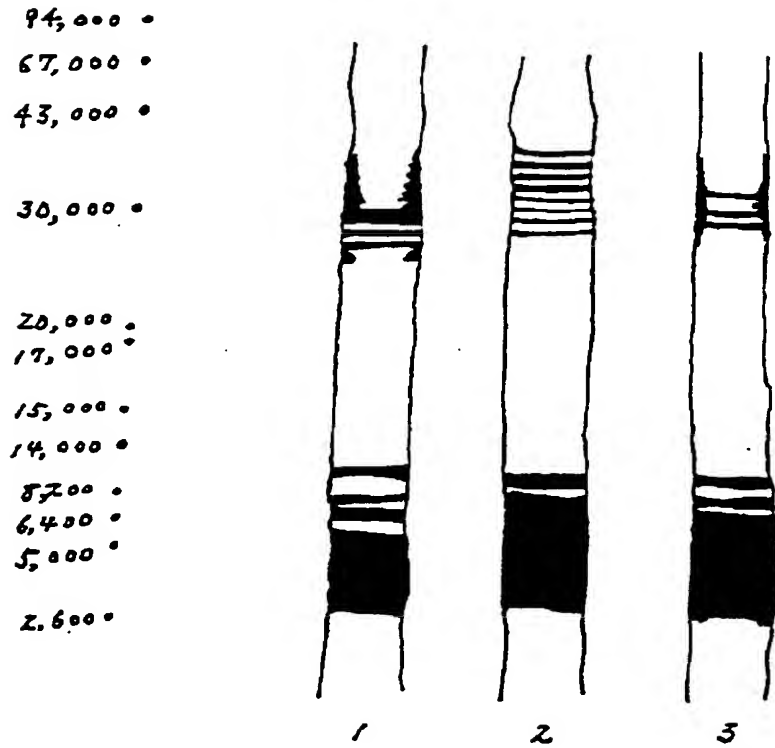
【図8】



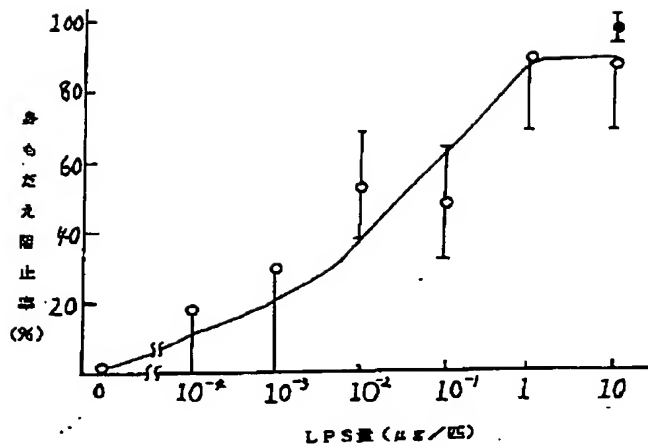
【図11】



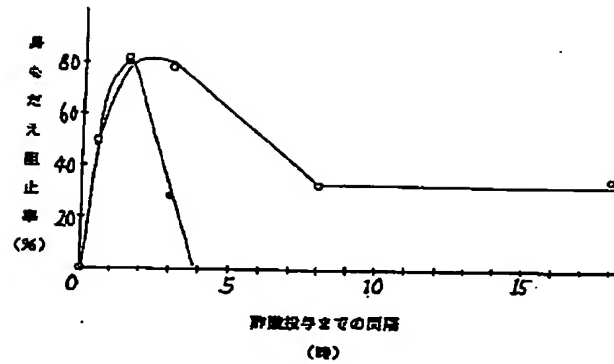
【図4】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(72) 発明者 月岡 大輔
千葉県千葉市春日 1-21-17
(72) 発明者 水野 伝一
神奈川県鎌倉市岡本18

(72) 発明者 大島 治之
東京都八王子市館町1097館ヶ丘団地 2-1
-513